

Б А К А Л А В Р И А Т

А.Н. Иванкин
Г.Л. Олиференко
А.В. Куликовский

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Рекомендовано
Экспертным советом УМО в системе ВО и СПО
в качестве **учебного пособия** для направления бакалавриата
«Химия»

BOOK.ru
ЭЛЕКТРОННО-БИБЛИОТЕЧНАЯ СИСТЕМА

КНОРУС • МОСКВА • 2021

УДК 543(075.8)

ББК 24.4я73

И19

Рецензенты:

А.А. Красноштанова, д-р хим. наук, проф.,

Ю.Н. Жилин, канд. техн. наук

Авторы:

А.Н. Иванкин, Московский государственный технический университет имени Н.Э.Баумана,

Г.Л. Олиференко, Московский государственный технический университет имени Н.Э.Баумана

А.В. Куликовский, лаборатория научно-методических работ и контрольно-аналитических исследований ФНЦ Пищевых систем РАН

Иванкин, Андрей Николаевич.

И19 Аналитическая химия : учебное пособие / А.Н. Иванкин, Г.Л. Олиференко, А.В. Куликовский. — Москва : КНОРУС, 2021. — 300 с. — (Бакалавриат).

ISBN 978-5-406-07293-6

Представлены методы, методики и расчеты проведения качественных и количественных измерений при идентификации различных веществ и соединений природного и синтетического происхождения.

Соответствует ФГОС ВО последнего поколения.

Для студентов бакалавриата, обучающихся по направлению «Химия».

Ключевые слова: аналитическая химия; методы аналитической химии; задачи аналитической химии.

УДК 543(075.8)

ББК 24.4я73

Иванкин Андрей Николаевич

Олиференко Галина Львовна

Олиференко Галина Львовна

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Изд. № 587361. Подписано в печать 13.01.2021. Формат 60×90/16.

Гарнитура «Newton». Печать офсетная.

Усл. печ. л. 19,0. Уч.-изд. л. 16,0. Тираж 500 экз.

ООО «Издательство «КноРус».

117218, г. Москва, ул. Кедрова, д. 14, корп. 2.

Тел.: +7 (495) 741-46-28.

E-mail: welcome@knorus.ru www.knorus.ru

Отпечатано в АО «Т8 Издательские Технологии».

109316, г. Москва, Волгоградский проспект, д. 42, корп. 5.

Тел.: +7 (495) 221-89-80.

© Иванкин А.Н., Олиференко Г.Л.,

Куликовский А.В., 2021

© ООО «Издательство «КноРус», 2021

ISBN 978-5-406-07293-6

Оглавление

Введение	6
Термины в аналитической химии	8
Глава 1. ОБЩИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ВЕЩЕСТВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ	10
1.1. Кристаллизация	10
1.2. Возгонка	17
1.3. Фильтрация и микрофильтрация	19
1.4. Перегонка	23
1.5. Экстракция	33
1.6. Мембранная фильтрация	38
1.7. Диализ и электродиализ	43
1.8. Лиофилизация (сублимация)	45
Глава 2. ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРОЦЕДУРАХ АНАЛИТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	51
Глава 3. АНАЛИЗ ВОДНЫХ СИСТЕМ	55
3.1. Определение содержания воды в образце. Эталонный метод ИСО	58
3.2. Определение pH. Эталонный метод ИСО	60
3.3. Определение химического потребления кислорода (ХПК)	63
Глава 4. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ИОНОВ В РАСТВОРЕ	69
4.1. Катионы 1-й аналитической подгруппы. Обнаружение NH ₄ ⁺ -ионов	71
4.2. Катионы 1-й аналитической подгруппы. Обнаружение K ⁺ -ионов	71
4.3. Катионы 2-й аналитической подгруппы. Обнаружение Na ⁺ -ионов	72
4.4. Катионы 2-й аналитической подгруппы. Обнаружение Mg ²⁺ -ионов	72
4.5. Катионы II аналитической группы. Обнаружение Ca ²⁺ -ионов	72
4.6. Катионы II аналитической группы. Обнаружение Ba ²⁺ -ионов	73
4.7. Катионы III аналитической группы. Обнаружение Al ³⁺ -ионов	73
4.8. Катионы III аналитической группы. Обнаружение Cr ³⁺ -ионов	73
4.9. Катионы III аналитической группы. Обнаружение Mn ²⁺ -ионов (по Н. А. Тананаеву)	74

4.10. Катионы III аналитической группы. Обнаружение Fe^{3+} -ионов	74	7.3. Определение бенз(а)пирена и других полициклических ароматических углеводородов	125
4.11. Катионы III аналитической группы. Обнаружение Fe^{2+} -ионов	75	7.4. Определение содержания азотсодержащих токсикантов (нитраты, нитриты, нитрозамины, биогенные амины, гистамин)	132
4.12. Катионы III аналитической группы. Обнаружение Co^{2+} -ионов	75	7.5. Анализ хлорорганических пестицидов	154
4.13. Катионы 1-й подгруппы IV аналитической группы. Обнаружение Cu^{2+} -ионов	75	Глава 8. АНАЛИТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЖИВЫХ И БИОСИСТЕМ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	171
4.14. Катионы 2-й подгруппы IV аналитической группы. Обнаружение Sn^{2+} -ионов	76	8.1. Анализ белков	171
4.15. Катионы 2-й подгруппы IV аналитической группы. Обнаружение Sn^{4+}	76	8.2. Энзиматическая активность белков	176
4.16. Катионы V аналитической группы. Обнаружение Ag^{+} -ионов	76	8.3. Анализ аминокислот	191
4.17. Катионы V аналитической группы. Обнаружение Pb^{2+} -ионов	77	8.4. Анализ жиров и жирных кислот	212
4.18. Обнаружение Cl^{-} -ионов	77	8.5. Определение содержания углеводов	232
4.19. Обнаружение Br^{-} -ионов	78	8.6. Определение содержания нуклеиновых кислот	240
4.20. Обнаружение I^{-} -ионов	78	Глава 9. АНАЛИТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СОДЕРЖАНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЖИВЫХ СИСТЕМ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В СЫРЬЕ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	246
4.21. Обнаружение NO_3^{-} -ионов	78	9.1. Анализ содержания витаминов	246
4.22. Обнаружение NO_2^{-} -ионов	78	9.2. Количественное определение содержания гормонов	274
4.23. Обнаружение S^{2-} -ионов	78	Заключение	298
4.24. Обнаружение SO_4^{2-} -ионов	79		
Глава 5. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ИОНОВ В РАСТВОРЕ. АНАЛИЗ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ	80		
5.1. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов в пищевых продуктах	81		
5.2. Определение содержания ионов Li^{+} , Na^{+} , NH_4^{+} , K^{+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} методом ионной хроматографии	87		
5.3. Определение содержания неорганических анионов (Cl^{-} , NO_2^{-} , Br^{-} , NO_3^{-} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) в растворе методом ионной хроматографии	91		
5.4. Определение содержания хлоридных ионов титрованием азотнокислым серебром	94		
Глава 6. МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА	98		
6.1. Определение массовой доли золы в твердом образце	98		
6.2. Определение содержания сухого остатка жидкого образца	100		
6.3. Определение содержания фосфора. Спектрофотометрический метод ИСО	101		
6.4. Определение содержания хлоридов методом Фольгарда. Содержание поваренной соли. Стандартный метод ИСО	104		
Глава 7. АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ТОКСИКАНТОВ В ОБЪЕКТАХ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	108		
7.1. Микробные токсины (афлатоксины B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1)	108		
7.2. Анализ ароматических и полициклических углеводородов	118		

Введение

Аналитическая химия — это значимый раздел науки, связанный с качественным и, что более важно, количественным определением содержания индивидуальных компонентов в сложных по составу объектах и образцах.

Аналитической химии сегодня приходится решать задачи по определению ничтожно малых примесей, идентификация которых затруднена.

Разноплановость природы определяемых веществ предопределяет необходимость использования сложной аппаратуры для решения аналитических задач на основе методов физико-химического анализа.

Прогресс современных научных исследований связан, прежде всего, с распространением в исследовательских лабораториях сложного компьютеризированного оборудования, позволяющего в автоматическом режиме осуществлять запись данных о компонентном составе конкретного образца. Применение высокоселективных хроматографических, электрофоретических, масс-спектрометрических и иммуноферментных методов дает возможность определять следовые количества веществ при очень низком уровне их содержания.

Усложнение экологической обстановки и введение в практику, особенно в развитых странах, повсеместного использования интенсивных сельскохозяйственных технологий с применением различных активных соединений, а также возможность существенного загрязнения продуктов органическими и неорганическими токсикантами приводит к необходимости тотального мониторинга их безопасности. Такой контроль может быть осуществлен с применением современных методов физико-химического анализа.

Современная аналитическая химия сегодня — это высокоточные количественные измерения содержания веществ с использованием методов физико-химического анализа, реализуемых с применением сложной инструментальной базы для получения статистически достоверных данных.

В настоящее пособие, предназначенном для студентов и аспирантов высшей школы, а также научных работников, включены важнейшие, реально действующие методики анализа, которые позволяют

решать аналитические задачи, а также обучаться практической работе в области аналитической химии. Основной акцент сделан на методах, применяемых для анализа сложных объектов природного происхождения, предназначенных для использования человеком

Представлены методы аналитического определения компонентов искусственного или природного происхождения, которые также используются в разных отраслях.

Термины в аналитической химии

аликвота, aliquot quantity
аналит (компонент, искомый или определяемый в пробе), analyte
аналитическая идентификация, analytical identification
аналитический контроль (объекта), analytical control of the object
аналитические работы, analytical works
аналитическая лаборатория, analytical laboratory
аналитический сигнал, analytical signal (response)
аналитическое оборудование, analytical equipment
верхняя [нижняя] граница диапазона, upper [lower] limit of concentration range
внутренний контроль результатов анализа, internal quality control of analysis results
валидация методики (проверка применимости методики), method validation
градуировка в химическом анализе вещества, calibration
градуировочная характеристика, calibration function
градуировочный образец, reference material calibration sample
диапазон определяемого содержания (аналита), concentration range
единичное определение, single determination
количественный анализ вещества, quantitative analysis
качественный анализ вещества, qualitative analysis
матрица химического состава вещества, matrix
методика аналитического контроля (объекта), test method
метод анализа вещества, nominal property method of analysis (analytical technique)
методика анализа вещества, method of analysis [analytical procedure, analytical protocol]
неопределенность отбора пробы вещества, uncertainty of sampling
отбор пробы вещества [материала] (объекта аналитического контроля), sampling
образец сравнения, blank
представительная проба объекта аналитического контроля, representative sample
погрешность отбора пробы вещества [материала], sampling error

подготовка пробы, sample preparation
параллельные определения, multiple determinations
предел обнаружения (аналита), limit of determination [limit of quantitation]
промах (в анализе вещества или материала), blunder
протокол анализа, test report
результат анализа пробы вещества, result of analysis
сертификат химического состава, certificate
холостой опыт, experiment blank (sample)
холостая проба вещества, blank sample
химический анализ вещества, chemical analysis (assay)
химический состав вещества, chemical composition
чувствительность (в анализе вещества и материала), limit of detection

Глава 1

ОБЩИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ВЕЩЕСТВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

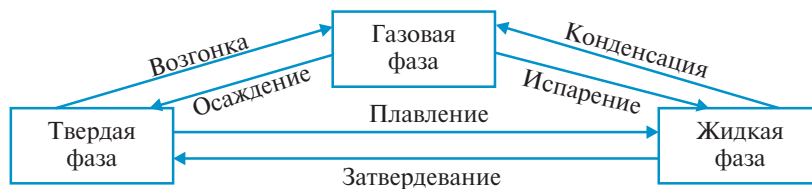
1.1. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ

Кристаллизацией называется процесс образования кристаллической упорядоченной фазы (кристаллов) из раствора, расплава или газовой фазы.

Кристаллы — твердые тела, характеризующиеся периодическим закономерным расположением частиц (молекул, атомов, ионов) в пространстве.

Наиболее простым элементом кристаллической решетки является элементарная ячейка, которая описывается элементами симметрии и является характеристикой кристаллической формы того или иного вещества. К элементам симметрии относятся оси симметрии, плоскости симметрии и др. По совокупности элементов симметрии кристаллы подразделяются на шесть систем: триклинную, моноклинную, ромбическую, тетрагональную, гексагональную и кубическую. Однако на практике кристаллы часто называют по внешнему виду: листочки, иглы, призмы, кубики, палочки, параллелепипеды и т. п.

Кристаллизация — один из важнейших методов получения чистых веществ. Процесс очистки кристаллизацией из раствора называется перекристаллизацией, из расплава — зонной плавкой, из газовой фазы — возгонкой. Фазовые переходы между различными агрегатными состояниями приведены на схеме:



Перекристаллизацией называется процесс очистки и разделения веществ, при котором вещество вначале растворяют при нагревании в подходящем растворителе, затем раствор охлаждают и вещества выкристаллизовываются в чистом виде.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Очистка веществ перекристаллизацией основана на разнице в растворимости целевого вещества и примесей в используемом растворителе. Оптимальным растворителем считается такой, в котором вещество имеет максимальную растворимость при температуре кипения и минимальную — на холоду (рис. 1.1). Существенным фактором при перекристаллизации является наличие центров кристаллизации, в отсутствие которых при охлаждении могут образовываться пересыщенные растворы. Такими центрами кристаллизации могут служить, например, кристаллы целевого вещества, или механические примеси. В некоторых случаях кристаллизацию инициируют путем испарения растворителя, тогда при охлаждении насыщенного раствора выпадает дополнительное количество кристаллов чистого вещества.

При проведении перекристаллизации очень важно правильно выбрать растворитель (см. табл. 1.1).

Растворитель должен иметь наиболее высокий температурный градиент растворимости.

Растворимость целевого вещества в выбранном растворителе должна заметно увеличиваться с ростом температуры.

Точка кипения растворителя должна быть ниже температуры плавления целевого вещества (в противном случае растворитель не следует нагревать до точки кипения), иначе вещество будет плавиться, а не растворяться в нагретом растворителе, и вместо кристаллизации при охлаждении будет наблюдаться застывание расплава.

Таблица 1.1

Ряд полярности растворителей

Полярность	Растворители	Полярность	Растворители
Низкая полярность	Петролейный эфир	Умеренная полярность	Ацетон
Умеренная полярность	Диэтиловый эфир	Высокая полярность	Этанол Вода

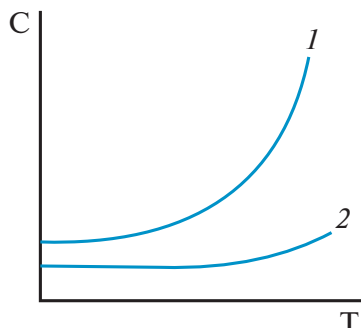


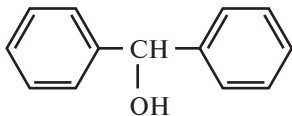
Рис. 1.1. Зависимость растворимости вещества (С) в различных растворителях от температуры (Т): 1 — растворимость вещества сильно зависит от температуры растворителя; 2 — растворимость вещества слабо зависит от температуры растворителя (для перекристаллизации следует использовать первый растворитель)

Температура кипения растворителя должна быть по возможности низкой, так как в этом случае кристаллы легче высушить.

Растворитель даже при температуре кипения должен быть инертным по отношению к целевому веществу.

Если предстоит перекристаллизовать неизвестное вещество, которое невозможно отнести к какому-либо определенному классу, приходится действовать эмпирическим путем. В тех случаях, когда формула вещества известна или его можно отнести к известному классу, действуют по определенной схеме. Прежде всего по структурной формуле вещества делают вывод о его гидрофильности или гидрофобности (неполярные группы: $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$ и др.; полярные группы: $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ и др.), на этом основании выбирают наиболее подходящий растворитель (табл. 1.1).

Подобный подход может быть проиллюстрирован на примере дифенилкарбинола:



Наряду с двумя гидрофобными фенильными группами в молекуле дифенилкарбинола присутствует гидрофильная группа $\text{OH}-$. В целом, такая молекула обладает средней полярностью, поэтому ее перекристаллизовывают из растворителей высокой полярности. При наличии только фенильных групп вещество относилось бы к неполярным и его следовало кристаллизовать из неполярной смеси петролейный эфир — толуол.

Подобный подход применяют для общей оценки с тем, чтобы сократить число возможных вариантов смеси растворителей. При этом такие параметры растворителей, как дипольный момент, диэлектрическая проницаемость, сольватирующие свойства и др., не учитываются. Однако, в конечном счете, в основе всех рекомендаций лежат результаты эксперимента.

Для многих соединений вставлены таблицы растворимости в различных растворителях и при различных температурах.

Если не удастся добиться хорошей очистки при помощи одного растворителя, то положительного эффекта достигают, используя пару растворителей, в которых растворимость целевого вещества может быть выше или ниже:

- петролейный эфир — диэтиловый эфир
- этанол — ацетон
- толуол — петролейный эфир
- этанол — вода
- хлороформ — петролейный эфир
- метанол — диэтиловый эфир
- хлороформ — четыреххлористый углерод
- метанол — дихлорметан этанол — петролейный эфир
- вода — ацетон
- этанол — диэтиловый эфир
- вода — уксусная кислота

Кроме того, известны специальные виды перекристаллизации.

Дробная кристаллизация. Возможность такого разделения объясняется неодинаковой растворимостью веществ при различных температурах. При некоторой определенной температуре раствор будет насыщенным в отношении одного и ненасыщенным в отношении другого вещества. Естественно, что в то время, когда первое вещество станет при охлаждении выпадать в осадок, второе еще будет полностью находиться в растворе.

Осаждение заменой одного растворителя другим. Этот способ применяется в том случае, когда вещество способно разлагаться при нагревании или изменять свой состав.

Способ заключается в том, что к концентрированному раствору вещества добавляют второй растворитель, в котором целевое вещество практически нерастворимо.

Далее выдерживают раствор при комнатной температуре или в холодильнике до завершения кристаллизации.

ПРИБОРЫ

Для проведения перекристаллизации чаще всего используют круглодонную колбу с обратным холодильником или, в редких случаях, колбу Эрленмейера.

Для перекристаллизации микроколичеств или пробных экспериментов — обычные пробирки.

Для нагревания пользуются колбонагревателем или баней.

При подборе растворителя необходимо прежде всего обратиться к специальной литературе или использовать табличные данные; в крайнем случае проводят предварительные опыты.

Небольшую порцию вещества (30–50 мг) смешивают в пробирке с 5–10 каплями растворителя (необходимо испытать, по крайней мере, три растворителя различной полярности) и раствор доводят до кипения. Если вещество полностью не растворяется, добавляют растворитель до полного растворения пробы. При охлаждении раствора должно выпасть по возможности наибольшее количество кристаллического осадка. После завершения предварительных опытов приступают к проведению основного эксперимента. Вещество помещают в круглодонную колбу подходящего объема и добавляют примерно 80% необходимого по теоретической или экспериментальной оценке количества растворителя, причем колба должна быть заполнена не более чем наполовину.

После добавления кипятыльников (мелкие кусочки фаянса, капилляры) присоединяют обратный холодильник и раствор нагревают до кипения.

Через холодильник небольшими порциями прибавляют дополнительное количество растворителя до полного растворения вещества. В целях безопасности и точности работы рекомендуется добавлять растворитель через капельную воронку. Наличие нерастворимых примесей не должно смущать: их отделяют при последующем фильтровании.

В случае, если раствор непрозрачен или окрашен, добавляют активный уголь и затем горячий раствор фильтруют (необходимо перед добавлением угля содержимое колбы немного охладить, так как при добавлении угля в нагретый раствор может произойти резкое вскипание или вспенивание). Когда вещество полностью растворится, нагрев отключают, и раствор медленно охлаждается до комнатной температуры. В большинстве случаев этого вполне достаточно, но иногда для повышения выхода кристаллического вещества раствор выдерживают в холодильнике.

В затруднительных случаях решающее значение приобретает фактор времени. Это связано с тем, что скорость понижения температу-

ры раствора влияет на размеры кристаллов. Если раствор охлаждается медленно, то образующиеся кристаллы постепенно растут и могут достигнуть иногда очень больших размеров, и, наоборот, при быстром охлаждении образуются мелкие кристаллы. При перекристаллизации стараются получать кристаллы промежуточных размеров.

Выращивание кристаллов часто требует терпения: этот процесс может длиться несколько дней, недель или даже месяцев. Однако в большинстве случаев хорошие выходы достигаются за несколько часов.

Выпавшее при кристаллизации вещество отделяют от маточного раствора путем фильтрования под вакуумом.

Маточный раствор сохраняют для последующей обработки (растворитель частично отгоняют в вакууме и повторяют стадию охлаждения, или полностью выпаривают раствор и повторяют кристаллизацию).

Исходные данные, результаты эксперимента и условия его проведения записывают в рабочем журнале.

При проведении кристаллизации иногда возникают затруднения, которые преодолевают при помощи специальных приемов. Если примеси нерастворимы на холоду или при нагревании, их отделяют фильтрованием. Если примеси хорошо растворимы, то при кристаллизации основного вещества они остаются в растворе.

При наличии окрашенных примесей или опалесценции к раствору добавляют гранулированный или активный порошкообразный уголь (1–2% в расчете на растворенное вещество) и нагревают раствор, не доводя до кипения, в течение 10–15 мин. Затем фильтруют нагретый раствор при нормальных условиях или под вакуумом, причем используют двойной слой фильтровальной бумаги или специальную бумагу, предназначенную для отделения активного угля. В случае неполярных растворителей вместо активного угля используют активированный оксид алюминия. При этом не следует применять большое количество адсорбента, так как могут происходить потери основного вещества за счет адсорбции. Опалесценцию обычно удается устранить с помощью кизельгура. Во всех указанных случаях перед внесением адсорбента раствор следует охладить до температуры ниже точки кипения (по крайней мере, на 10 °С), чтобы избежать бурного вскипания.

МИКРОКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ

Кристаллизация небольших количеств веществ (до 100 мг) обладает своей спецификой. Образец помещают в небольшую лабораторную или центрифужную пробирку, добавляют соответствующий раство-

ритель и. нагревают. После охлаждения до комнатной температуры пробирку помещают в ледяную баню и маточный раствор отбирают пипеткой, при этом кончик пипетки вводят под слой кристаллов. Аналогичным способом проводят и промывание кристаллов. Затем пробирку помещают в вакуум-эксикатор для высушивания вещества. Эти операции (отделение маточника и промывание) можно проводить путем центрифугирования и декантации.

ОТСУТСТВИЕ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

Если кристаллы вообще не образуются, то раствор переохлаждают до температуры от +4 до $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в зависимости от температуры плавления вещества и растворителя. Затем медленно нагревают раствор и вносят затравочный кристалл (по возможности один) (см. также разд. «Маслообразование»).

МАСЛООБРАЗОВАНИЕ

Если при перекристаллизации вместо кристаллов целевого вещества образуются капли «масла», это свидетельствует о наличии примесей, которые препятствуют кристаллизации, причем примеси могут растворяться в «масле» и затруднять дальнейшую очистку. Такое явление часто наблюдается при очистке низкоплавких веществ. В этом случае полезно:

- использовать большее количество растворителя и повторить очистку;
- добавить активный уголь, высушить над сульфатом магния, отфильтровать, растворитель выпарить в вакууме, остаток снова перекристаллизовать;
- добавить кристалл того же или сходно кристаллизующегося вещества в раствор, а еще лучше — в пересыщенный раствор;
- потереть стеклянной палочкой по стенкам колбы или добавить кипятильник;
- отделить «масло» и перекристаллизовать из другого растворителя, в конце концов, несколько раз заменить растворитель;
- встряхивать некоторое время раствор при помощи специальной аппаратуры или обработать ультразвуком;
- провести осаждение вещества заменой одного растворителя другим.

При работе с легкоокисляющимися веществами используют стандартные приборы, которые продувают инертным газом, или специальную аппаратуру, например трубки Шленка.

Избыток растворителя (это ведет к снижению выхода или отсутствию кристаллизации). Рекомендации: уменьшить объем растворителя путем упаривания в роторном испарителе.

Кристаллизация плохо растворимых примесей вместе с целевым веществом. Рекомендации: растворять вещество не полностью и фильтровать раствор горячим; использовать другие растворители.

Слишком быстрое охлаждение (способствует соосаждению или адсорбции примесей).

Смешанная кристаллизация при наличии в растворе нескольких веществ.

Слишком длительное нагревание с обратным холодильником (вызывает химические изменения целевого вещества).

Недостаточный для полной кристаллизации период времени.

Загрязнение вакуумной смазкой раствора (препятствует кристаллизации).

Рекомендации: использовать небольшое количество смазки.

ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наименование растворителей для перекристаллизации обычно указывают в описании работы или дают в скобках после данных о температуре плавления исследуемого вещества. Например: $T_{пл}\ 117\text{ }^{\circ}\text{C}$ (этанол); $T_{пл}\ 145\text{ }^{\circ}\text{C}$ (этанол — вода; 1:1).

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Очистка неорганических и главным образом органических веществ. Методы используются при получении высокоочищенных стандартных образцов индивидуальных веществ. Результаты очистки контролируют следующими методами: тонкослойной хроматографией, спектроскопией ЯМР, определением точки плавления.

Разделение веществ, имеющих различную растворимость, методом дробной кристаллизации.

Получение веществ в кристаллическом виде.

Фракционирование полимеров по молекулярной массе.

1.2. ВОЗГОНКА

Процесс перехода вещества из твердого состояния непосредственно в газообразное, минуя жидкую фазу, называется возгонкой.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Фазовое состояние системы зависит определенным образом от основных параметров состояния — температуры, давления, объема.

В принципе возгоняться способны практически все вещества, однако в большинстве случаев этот процесс идет лишь при крайне низком давлении. Из органических веществ только относительно немногие соединения способны возгоняться при нормальном давлении, например камфора и некоторые соединения ароматического ряда (табл. 1.2). Условием применения возгонки как метода выделения и очистки, помимо высокого давления паров целевого соединения, является достаточно большое различие между давлением паров исследуемого вещества и примесей.

Принцип возгонки в вакууме используется также при лиофилизации, однако конечным продуктом в этом случае является не сублимат, а сухой остаток.

Таблица 1.2

Свойства легковозгоняемых веществ

Соединение	Т _{кип} °С	Т _{пл} °С	Давление паров при температуре кипения		Соединение	Т _{кип} °С	Т _{пл} °С	Давление паров при температуре кипения	
			кПа	мм рт. ст.				кПа	мм рт. ст.
Камфора	204	179	49,32	370	Бензол	79	11	4,80	36
Йод	185	114	11,98	90	Нафталин	218	82	0,93	7
Антрацен	340	218	5,46	41	Бензойная кислота	132	122	0,80	6

ПРИБОРЫ

Для возгонки применяют *комплектные приборы на шлифах* (или самостоятельно изготовленный прибор) *из двух стеклянных пробирок с отводами*.

Для проведения предварительных опытов применяют *две пробирки различных размеров* или *два часовых стекла*.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Тонко измельченный образец вещества помещают во внешний сосуд (в лаборатории обычно работают с порциями вещества менее 1 г).

Включают вакуумный насос и подачу воды, создают вакуум в системе.

Медленно нагревают образец до появления первых кристалликов сублимата.

По завершении возгонки отключают нагрев, вакуум и охлаждение, соединяют охлаждаемую пробирку и счищают сублимат.

Иногда перед началом работы проверяют способность вещества к возгонке. Для этого образец нагревают в приборе для определения температуры плавления. Если вещество возгоняется легко, на верхней охлажденной части капилляра наблюдается появление сублимата.

Помимо возгонки в вакууме существует способ возгонки в токе инертного газа или воздуха.

ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Охлаждаемая поверхность слишком мала для взятого количества образца.

Слишком большое расстояние между охлаждаемой поверхностью и образцом (оптимальное расстояние не более 1 см).

Слишком медленный нагрев. Вещество недостаточно измельчено.

ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сведения об условиях возгонки вещества приводятся вместе с данными об определении температуры плавления, например: $t_{пл}^{1,3} = 87\text{ °С}$ (возг.). Это означает, что вещество возгоняется при 87 °С и давлении 1,3 кПа (примерно 10 мм рт. ст.).

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Возгонка является универсальным методом очистки небольших количеств вещества, содержащего нелетучие примеси. Если же вещества много, то предпочтительнее использовать перекристаллизацию или хроматографические методы. Возгонка позволяет получать вещества высокой степени чистоты.

1.3. ФИЛЬТРОВАНИЕ И МИКРОФИЛЬТРАЦИЯ

Фильтрованием называется разделение неоднородных систем жидкость — твердые частицы или газ — твердые частицы при помощи пористых фильтрующих материалов.

Микрофильтрацией называется фильтрование (разделение) суспензий на полупроницаемых мембранах.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Движущей силой процесса фильтрования является разность давления по обе стороны фильтрующего материала. В лаборатории чаще всего применяется обычное фильтрование, когда жидкость проходит через фильтр под давлением небольшого столба жидкости, находящегося над фильтром, или фильтрование под вакуумом, когда жидкость проходит через фильтр под давлением почти в 1 атм. Фильтрование под вакуумом характеризуется высокой скоростью и эффективностью. Фильтрование под давлением применяется реже, однако имеет определенные преимущества, так как позволяет проводить процесс в атмосфере инертного газа и использовать растворители с высокой летучестью.

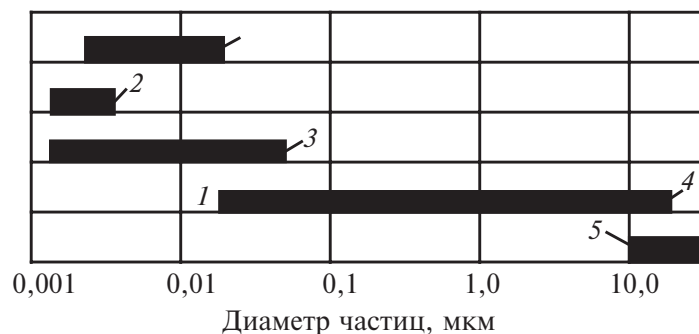


Рис. 1.2. Различные способы фильтрования в зависимости от размеров частиц: 1 — мембранная фильтрация, 2 — электродиализ, 3 — диализ, 4 — микрофильтрация, 5 — обычное фильтрование

В зависимости от размеров отделяемых частиц (табл. 1.3), а следовательно, и от способа фильтрования применяют фильтры различной плотности. В случае микрофильтрации диаметр пор составляет 0,01–10 мкм. Микрофильтры, в отличие от мембранных фильтров, предназначены для ультрафильтрации и обратного осмоса.

Таблица 1.3

Размеры частиц

Частицы	Размеры, мкм	Частицы	Размеры, мкм
Асбестовая пыль	<	Угольная пыль	1–70
Атмосферная пыль		Морская пыль	0,03–0,3
Бактерии		Металлическая пыль	0,01–60
Эритроциты		Вирусы	<
Красители			

ПРИБОРЫ

В лаборатории применяются три основных типа воронок (рис. 1.8): *воронки Бюхнера* для больших количеств веществ, *воронки Хирша* для небольших количеств веществ и *воронки со стеклянными пористыми фильтрами* (фильтр Шотта), достоинством которых являются незначительные потери вещества при фильтровании. Воронки с пористыми фильтрами маркируются в соответствии с сортом стекла пористой пластинки (G — иенское стекло, D — стекло типа дюран, В — кварцевое стекло).

Недостатком этих воронок является непрочность пористой пластинки, поэтому рекомендуется промывать их сразу после использования (так как присохшие частицы вещества существенно затрудняют промывание пористой пластинки). Промывание ведется в противотоке или под давлением.

Успешное фильтрование возможно лишь при правильном выборе плотности фильтра (табл. 1.3).

Таблица 1.4

Области применения фильтров с различным диаметром пор

Номер фильтра	Максимальный размер пор, мкм	Область применения
0	200	Удерживание на фильтре наиболее крупных частиц (пыли, дыма), барботирование газов в слое жидкости
1	150	Удерживание на фильтре крупнодисперстных осадков, барботирование газов в слое жидкости
2	80	Препаративное фильтрование кристаллических осадков
3	40	Аналитическое и препаративное фильтрование тонкодисперсных осадков
4	14	Аналитическое фильтрование тонкодисперсных осадков
5	1,5	Микрофильтрация клеточных суспензий (стерилизующая фильтрация)

При работе с микроколичествами веществ, применяют специальные воронки.

Для фильтрования горячих растворов применяют фильтры с подогревом; в простейших случаях стеклянную воронку помещают в обогреваемый кожух.

Для фильтрования растворов веществ, изменяющихся под действием воздуха, применяют прибор для фильтрования в атмосфере инертного газа.

Выбор фильтрующего материала зависит как от требований к чистоте раствора (важно, чтобы фильтр полностью задерживал нерастворимые частицы), так и от свойств самого фильтра.

Круги фильтровальной бумаги должны соответствовать размерам фильтрующей поверхности воронки и полностью ее закрывать.

Складчатые фильтры могут быть изготовлены промышленным способом или самостоятельно из фильтровальной бумаги. Их целесообразно использовать тогда, когда целевым продуктом является фильтрат. Благодаря большой поверхности складчатых фильтров фильтрование протекает достаточно быстро.

Микрофильтры изготавливают из поликарбоната, политетрафторэтилена (тефлона) или других полимерных материалов. Поликарбонатные фильтры устойчивы к действию большинства органических кислот и растворителей, однако неустойчивы к действию оснований и галогенсодержащих углеводородов.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

В качестве примера рассмотрим фильтрование под вакуумом.

Колбу Бунзена с воронкой и фильтром присоединяют к склянке Вульфа (небольшая жестко закрепленная трехгорлая склянка).

Поверхность фильтровальной бумаги смачивают небольшим количеством растворителя, который используется для растворения целевого вещества.

Включают вакуум-насос и проверяют равномерность прилегания фильтра к фильтрующей пластинке.

Суспензию переливают в воронку, жидкость отсасывают, систему разгерметизируют (при помощи трехходового крана).

Вещество на фильтре заливают холодным растворителем, через некоторое время вновь включают насос (промывание осадка на фильтре). На этой стадии можно заменить высококипящий растворитель на низкокипящий с близкими по растворимости свойствами, чтобы ускорить промывание осадка на фильтре.

Осадок на фильтре отжимают стеклянной пробкой для более полного удаления растворителя (остаток на фильтре все еще содержит не менее 5–20% растворителя).

Микрофильтрация проводится аналогичным образом. Иногда при этом рекомендуется поместить сверху на фильтр предфильтр из стекловолокна, чтобы уменьшить вероятность потери вещества. Для отделения тонких осадков, которые впоследствии можно потерять, применяют специальные сорбирующие материалы — кизельгель, целлюлозный порошок. При невозможности отделения тонких осадков фильтрованием следует применять центрифугирование.

ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Размер фильтра не соответствует размерам воронки (следует тщательно подгонять фильтр, иначе возможны потери вещества).

Фильтр не прилегает к краю воронки, т.е. при присасывании фильтра к поверхности воронки образуются складки.

Неправильно выбрана плотность фильтра (происходит забивание пор или существенное замедление процесса).

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Фильтрование: выделение и разделение веществ; гравиметрический анализ; очистка воды и воздуха.

Микрофильтрация: дегазация жидкости; концентрирование клеточных суспензий, стерилизующая фильтрация.

1.4. ПЕРЕГОНКА

Перегонка — процесс разделения и очистки веществ, при котором жидкое или расплавленное вещество испаряется при нормальном давлении и вновь конденсируется в приемнике.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Давление пара над жидкостью возрастает при повышении температуры вследствие увеличения кинетической энергии молекул. Когда давление пара над жидкостью достигает значения атмосферного давления, жидкость закипает. Зависимость температуры кипения от давления описывается уравнением Клапейрона — Клаузиуса.

Точку кипения обычно указывают при нормальном атмосферном давлении (101,3 кПа, или 760 мм рт. ст., или 1 атм.). Если место проведения опыта находится не на уровне моря, то вводится так называемая барометрическая поправка (коррекция). Как правило, очистку веществ осуществляют при помощи перегонки при атмосферном давлении.

Некоторые смеси не удается разделить при помощи перегонки, даже если компоненты имеют различные температуры кипения. Это происходит в том случае, когда пар и жидкость имеют одинаковый состав. Такая смесь называется азеотропной смесью или азеотропом. Она ведет себя при перегонке как гомогенное вещество и перегоняется при постоянной температуре.

ПРИБОРЫ

Прибор для обычной перегонки включает жидкостную или электрическую бани, круглодонную колбу, термометр, холодильник с форштоссом и отводом и приемную колбу (комплект может включать отдельную колбу, насадку Кляйзена, холодильник и алонж).

Роторный испаритель пригоден для перегонки небольших масс веществ от 50 мг до 5 г или для высококипящих жидкостей.

Двойная V-образная трубка применяется для очистки микроколичеств веществ (10–500 мг).

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Перед началом обычной перегонки вещество высушивают, чтобы исключить образование азеотропа или гидролиз вещества при повышенной температуре. Сушитель перед перегонкой отфильтровывают.

Вещество помещают в круглодонную колбу (не более 2/3 объема), добавляют кипятильники (в случае нагревания колбы при помощи бани) или магнит (в случае магнитной мешалки). Каждый раз перед новым нагреванием колбы добавляют свежий кипятильник.

Таблица 1.4

Состав и температура кипения бинарных и тройных азеотропов

Состав азеотропа	Температура кипения, °С	Температура кипения компонентов, °С	Состав, %	Состав азеотропа	Температура кипения, °С	Температура кипения компонентов, °С	Состав, %
Вода–дихлорметан	39	100 40	2 98	Этанол–бензол	68	78 80	32 68
Вода–хлороформ	56	100 61	3 97	Бензол–вода	69	80 100	91 9
Вода–ацетон	56	100 56	12 88	Этанол–вода–толуол	74	78 100 111	37 12 51
Этанол–хлороформ	59	78 61	7 93	Этанол–вода	78	78 100	96 4
Этанол–бензол–вода	65	78 80 100	19 74 7	Толуол–вода	85	111 100	80 20

В табл. 1.4 приведены температуры кипения и состав азеотропных жидкостей

Включают подачу воды в холодильник и нагревают колбу. Регулируя нагрев, устанавливают определенную скорость перегонки (нормальная скорость перегонки 1–2 капли дистиллята в 1с).

Перегонку прекращают, когда в колбе еще остается немного жидкости и температура кипения остатка на 2–3 °С начинает превышать температуру кипения дистиллята.

Начальную, основную и более высококипящие фракции собирают в отдельные емкости и отмечают в рабочем журнале пределы температуры кипения каждой фракции.

При перегонке во влажной атмосфере на отвод холодильника (алонж) надевают хлоркальциевую трубку.

Таблица 1.5

Общепринятые теплоносители для заполнения бань

Теплоноситель	Температура бани, °С
Вода	0–95
Триэтиленгликоль	0–250
Силиконовое масло	0–350
Глицерин	–20–260
Сплав Вуда (50% Bi, 25% Pb, 12,5% Sn, 12,5% Cd)	70–350

ПЕРЕГОНКА В РОТОРНОМ ИСПАРИТЕЛЕ

Колбу заполняют жидкостью до уровня отводной трубки со сферическим шлифом (примерно 1/3 объема) и нагревают на воздушной бане. При этом колбу вращают или покачивают, чтобы избежать вскипания. В случае необходимости перегонку ведут при пониженном давлении. Вещества с высоким давлением пара лучше всего перегонять при нормальном давлении. Дистиллят собирают в круглодонные колбы.

ПЕРЕГОНКА В ДВОЙНОЙ U-ОБРАЗНОЙ ТРУБКЕ

В первую петлю U-образной трубки помещают вещество, после чего конец трубки запаивают. Петлю с веществом охлаждают и в системе устанавливают вакуум. Охлаждают вторую (приемную) петлю; при нагревании первой петли вещество конденсируется в нижней части второй петли.

ПЕРЕГОНКА АЗЕОТРОПА В ПРИБОРЕ С ЛОВУШКОЙ-СЕПАРАТОРОМ

Перед перегонкой к целевому веществу прибавляют растворитель, образующий с водой азеотроп. Азеотроп перегоняют в приборе с ловушкой-сепаратором (рис. 1.19), после чего перегоняют не содержащее влаги целевое вещество.

ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Вещество предварительно не высушено.

Шарик термометра расположен не точно против входа в холодильник и вследствие этого не полностью окружен парами вещества, что приводит к непрерывному определению температуры кипения.

Для высококипящих веществ используют не водяной, а воздушный холодильник.

Температура перегонки на 3–4 °С отличается от истинной температуры кипения вещества. Это указывает на недостаточно чистое вещество или на перегонку смеси, что требует дополнительной очистки методом ректификации или любым другим методом.

ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Необходимо указать способ перегонки и температуру кипения (или интервал температур кипения).

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Перегонка является важнейшим методом разделения и очистки жидких и способных перегоняться при нормальном давлении твердых веществ с температурой кипения примерно до 180 °С.

ПЕРЕГОНКА ПРИ ПОНИЖЕННОМ ДАВЛЕНИИ (ВАКУУМНАЯ ПЕРЕГОНКА)

Зависимость между давлением пара и температурой кипения вещества описывается уравнением Клапейрона — Клаузиуса:

$$d \ln p / dT = \Delta H_0 / RT^2.$$

Предположив, что молярная теплота испарения не зависит от температуры, после интегрирования получают следующее уравнение:

$$\ln p = (-\Delta H_0 / RT) + C,$$

где p — давление; ΔH_0 — молярная теплота испарения; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура; C — константа.

Для оценки температуры кипения вещества при определенном давлении обычно используют номограммы зависимости температуры от давления для различных групп веществ (табл. 1.6).

ПРИБОРЫ

Прибор для перегонки в вакууме аналогичен прибору для обычной перегонки. Дополнительными элементами в случае перегонки в вакууме являются капилляр, вакуумный насос, предохранительная склянка или охлаждаемая ловушка, манометр, насадка для отбора фракций.

Капилляр — тонкая стеклянная трубочка, укрепленная в горле перегонной колбы, применяется для равномерного кипения жидкости в вакууме. Очень тонкие капилляры вытягивают из обычной стеклянной трубки. Толщина капилляра должна быть такой, чтобы при продувании воздуха через ацетон или другой растворитель проходили лишь отдельные пузырьки.

Таблица 1.6

Группы веществ

Группа 1	Группа 3	Группа 5
Антрацен Антрахинон Фенантрен Трихлорэтилен	Ацетальдегид Ацетон Хлоранилин Сложные эфиры Этиленоксид	Бензиловый спирт Метиламин Фенол Пропионовая кислота
Группа 2	Муравьиная кислота Нафтол Нитробензол	Группа 6
	Группа 4	Уксусный ангидрид Изомасляная кислота Вода
Бензальдегид Бензонитрил Бензофенон Камфора Простые эфиры Галогенуглеводороды Углеводороды Метилэтилкетон Хинолин	Уксусная кислота Ацетофенон Крезол Этиламин	Группа 7
		Бензойная кислота Масляная кислота Этиленгликоль Метанол
		Группа 8
		Амиловый спирт Этанол Изобутанол <i>n</i> -Пропанол

Вакуумный насос. Наиболее простым и чаще всего используемым устройством для вакуумирования является водоструйный насос, который обеспечивает давление порядка 1,3–4,4 кПа (10–33 мм. рт. ст.) (слабый вакуум). Давление, создаваемое водоструйным насосом, соответствует давлению паров воды при температуре окружающей среды (табл. 1.7). Применение водоструйного насоса позволяет отказаться от использования ловушки с охлаждением и применять предохранительную склянку Вульфа. Недостатками водоструйного насоса являются большой расход воды и нестабильность создаваемого вакуума вследствие колебания давления в водяной сети. Применение ротационного масляного насоса позволяет уменьшить давление с 400 до 0,133 Па ($3 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст.) (средний вакуум). Давление, создаваемое масляным насосом, соответствует давлению паров масла. В особых случаях применяют ртутный диффузионный насос, который позволяет уменьшить давление до $1,3 \cdot 10^{-6}$ Па (глубокий вакуум).

Охлаждаемая ловушка. Обычно при работе с ротационным вакуумным насосом применяют одну или несколько ловушек, охлаждаемых жидким азотом или смесью ацетона с сухим льдом. Ловушка предохраняет масло в насосе от загрязнения и разбавления летучими веществами, например растворителями, и одновременно предотвращает коррозию металлических частей насоса.

Роторный испаритель. Применяется для концентрирования раствора путем испарения в вакууме. Преимущество роторного испарителя заключается в том, что большая поверхность испарения повышает скорость выпаривания растворителя. Вращение колбы препятствует вскипанию жидкости, возможность поддержания низкой температуры кипения раствора исключает разложение растворенного вещества. Помимо этого имеется возможность непрерывного выпаривания больших объемов раствора: по мере отгонки растворителя новые порции раствора подают в перегонную колбу через специальную трубку.

Таблица 1.7

Давление водяного пара при различных температурах

Температура, °С	Давление		Температура, °С	Давление	
	Па	мм.рт.ст.		Па	мм.рт.ст.
0	532	4	20	2400	18
5	800	6	25	3200	24
10	1200	9	30	4266	32
15	1733	13	35	5600	42

Манометр. Используется при проведении вакуумной перегонки для точной регистрации давления. Обычно в лаборатории применяют ртутные манометры, в которых разрежение определяют по перепаду высоты ртутного столбика в двух параллельных трубках. Вакуум с остаточным давлением менее 1–2 мм рт. ст. измеряют манометром Маклеода.

Для измерения манометр из нормального положения (резервный баллон расположен горизонтально и заполнен ртутью) переводят в положение измерения. Для этого манометр медленно поворачивают по часовой стрелке. При этом ртуть заполняет измерительный баллон и поднимается по капилляру.

Насадка для отбора фракций. Применяется, когда при вакуумной перегонке необходимо собрать несколько фракций. Насадка Аншюца — Тиле — неограниченное число фракций, насадка «Паук» позволяет собрать 3–4 отдельные фракции.

Перегонка небольших количеств (от 10 мг до 2 г) осуществляется в специальном микроприборе. Его применение позволяет уменьшить потери при перегонке.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ ОПЕРАЦИЙ

(Надеть защитные очки!)

Перед началом работы проверяют надежность (герметичность) прибора. Вещество помещают в колбу и вставляют керн с капилляром.

Систему вакуумируют, нагревают, убеждаются в стабильности вакуума на основании показаний манометра.

По окончании перегонки выключают нагрев, дают прибору остыть и медленно подают воздух в прибор.

При перегонке в атмосфере инертного газа прибор несколько раз вакуумируют, а затем заполняют его инертным газом (азотом, аргонном, диоксидом углерода).

ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Прибор негерметичен, так как шлифы загрязнены или неправильно смазаны (после нанесения смазки шлиф должен быть прозрачен).

Температура кипения вещества слишком низкая (температура кипения вещества при нормальном давлении должна быть не ниже 150 °С).

Перегонка веществ с температурой кипения выше 150 °С. Перегонка веществ, разлагающихся при простой, перегонке. Перегонка в атмосфере инертного газа.

ПЕРЕГОНКА В ПРОТИВОТОКЕ (РЕКТИФИКАЦИЯ)

Ректификацией называется процесс перегонки, при котором часть конденсата находится в постоянном контакте с парами вещества, в результате чего между ними устанавливается равновесие. При этом удается разделить вещества с очень близкими температурами кипения.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Принцип противоточной перегонки обычно наглядно отображают на диаграммах кипения. Например, смесь, содержащая 25% циклогексана и 75% толуола, имеет температуру кипения 100 °С, в то время как пары этой смеси при той же температуре содержат 57% циклогексана.

Это максимальное разделение, которого можно достичь при помощи обычной перегонки. Для получения чистого циклогексана требуется многократное повторение перегонки. Если теперь сконденсировать пары, то получают жидкость, которая кипит при 90 °С. Если перегонять конденсат, то в паровой фазе доля циклогексана составит 85%. Последовательное многократное повторение этого процесса осуществляется в ректификационной колонке. При равновесной дистилляции происходят только однократное испарение и конденсация вещества.

Эффективность таких колонок описывается числом теоретических тарелок и зависит от площади контакта между двумя фазами. Число теоретических тарелок примерно соответствует числу простых перегонок, необходимых для достижения того же эффекта разделения, который достигается перегонкой на ректификационной колонке. Условием высокой эффективности ректификации является более интенсивный массо- и теплообмен, благодаря которому может достигаться равновесие между паровой и жидкой фазами. Число необходимых теоретических тарелок для получения дистиллята с предельным содержанием примесей 1% в зависимости от разности точек кипения компонентов обычно определяют графически.

Для проведения процесса ректификации используются стандартные приборы для перегонки, однако между круглодонной колбой и насадкой помещают *ректификационную колонку*, необходимую для увеличения поверхности контакта паров с жидкостью.

В лабораториях чаще всего используют колонку Вигре. Она представляет собой елочный дефлегматор высотой 20–30 см, помещенный в стеклянную трубку («рубашку»). Пространство между обеими трубками вакуумировано, что способствует лучшей теплоизоляции колонки. Разделение в колонках ведут в адиабатических условиях, поэтому

часто дополнительно «рубашку» изолируют такими материалами, как алюминиевая фольга или асбестовый шнур.

Колонка Вигре применяется при разности температур кипения 15–20 °С. При меньшей разнице температур кипения используют колонки со специальными наполнителями или колонки специальной конструкции.

Для ректификации также используют *колонки специальной конструкции* (так называемые колонки с вращающейся обмоткой), которые состоят из длинных, вертикально расположенных трубок, имеющих по всей длине ленточную обмотку из стали, платины или тефлона. Во время перегонки ленточная обмотка быстро вращается (до 3000 об/мин). Таким путем достигается перемешивание паров, что обеспечивает интенсивный массо- и теплообмен.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Колонку заполняют насадкой в вертикальном положении. Ректификацию проводят практически так же, как обычную перегонку. Во время перегонки нельзя допускать слишком сильного нагрева, чтобы избежать так называемого «захлебывания» колонки.

ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

- Неправильно выбран тип колонки.
- Повышение температуры кипения из-за разгерметизации колонки.
- Неудовлетворительная изоляция колонки.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Разделение и очистка веществ с разницей в температурах кипения менее 40 °С. Использование в тех случаях, когда обычная перегонка не приводит к удовлетворительным результатам.

ПЕРЕГОНКА С ВОДЯНЫМ ПАРОМ

Процесс осуществляется путем пропускания водяного пара через нагретую суспензию (эмульсию) целевого вещества в воде и применяется для перегонки нерастворимых в воде и высококипящих веществ при нормальном давлении и температуре не выше 100 °С.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Перегонка с водяным паром является особым случаем перегонки азеотропа. Метод основан на сложении давления паров компонентов. Общее давление p бинарной смеси представляет собой сумму давлений паров обоих компонентов — p_1 и p_2 , $p = p_1 + p_2$.

Смесь перегоняется при температуре, при которой суммарное давление обоих компонентов равно атмосферному. Температура кипения гетерогенной смеси лежит ниже температуры кипения отдельных компонентов, в то время как температура кипения гомогенной смеси находится между температурами кипения отдельных компонентов. Таким образом водонерастворимые или слаборастворимые в воде вещества становятся летучими при температурах ниже их температур кипения и могут быть выделены при помощи перегонки с водяным паром.

Эффективность метода можно продемонстрировать на примере разделения смеси 2- и 4-нитрофенолов, которые не удается разделить другими методами. Различное положение гидроксильных групп в обоих изомерах ведет к различиям в их свойствах.

Образование внутримолекулярной водородной связи в *орто*-изомере повышает его летучесть с водяным паром, тогда как образование межмолекулярных водородных связей в *пара*-изомере уменьшает его летучесть с водяным паром.

Отношение мольных долей компонентов дистиллята пропорционально отношению давления паров обоих компонентов: $n_1 / n_2 \approx p_1 / p_2$, где n_1 и n_2 — мольные доли компонентов 1 и 2

На практике очистка веществ данным методом требует большего количества воды по сравнению с рассчитанным, так как равновесие предполагает полную несмешиваемость обоих компонентов, а этот случай встречается крайне редко.

Вещества, способные перегоняться с парами воды, принадлежат, как правило, к следующим классам: ароматические и алифатические углеводороды, галогенуглеводороды, спирты, альдегиды, кетоны, ненасыщенные соединения.

ПРИБОРЫ

Типичный прибор для перегонки с водяным паром состоит из парогенератора с мерной трубкой, отводной трубки для подачи пара и собственно перегонного аппарата. Насадка Гопкина снижает вероятность переброса в холодильник твердых веществ или жидкой фазы.

Для перегонки полумикроколичеств веществ используется специальный микроприбор.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Прежде всего определяют летучесть вещества с водяным паром. Для этого 0,5–1 мл (или г) образца нагревают до кипения с 2–3 мл

воды в пробирке с охлаждаемым пальцем (или соединенной со второй пробиркой, охлаждаемой льдом).

Помутнение конденсата свидетельствует о летучести вещества с водяным паром. Лучше же попытаться провести перегонку в приборе для полумикроколичеств.

Вещество помещают в колбу с водой (в соотношении 1:1), заполняя колбу примерно наполовину.

Нагревают парогенератор и колбу; по достижении постоянного потока пара прекращают нагрев колбы, так как тепла подводимого пара достаточно для перегонки.

По окончании перегонки отсоединяют парогенератор от колбы, предварительно отключив нагрев.

Дистиллят переносят в делительную воронку, разделяют верхний и нижний слои; если вещества смешиваются с водой или образуют стабильные эмульсии, то их выделяют методом экстракции, а суспензии отфильтровывают на воронке.

Органический слой, содержащий целевой продукт, высушивают, растворитель выпаривают в вакууме.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Выделение, разделение и очистка веществ, плохо растворимых или нерастворимых в воде, но в то же время летучих с парами воды (особенно полезно в случае высококипящих и термолabileльных веществ, например эфирных масел).

Избирательная перегонка из смесей веществ, летучих с парами воды.

1.5. ЭКСТРАКЦИЯ

ЭКСТРАГИРОВАНИЕ ТВЕРДЫХ ВЕЩЕСТВ И ЖИДКОСТЕЙ

Экстракцией называется процесс извлечения при помощи растворителя отдельных компонентов сложной смеси. При работе с твердыми образцами (тонкоизмельченным порошком) используют различную растворимость отдельных компонентов смеси, при экстракции из раствора — различное распределение компонентов смеси в двух несмешивающихся жидкостях: $C_v / C_n = K$, где C_v — концентрация вещества в верхней (более легкой) фазе; C_n — концентрация вещества в нижней (более тяжелой) фазе; K — коэффициент распределения.

Согласно закону Нернста, отношение концентраций вещества, растворенного в двух несмешивающихся, но находящихся в равновесии жидких фазах, при постоянной температуре не зависит от их абсолютных количеств и, следовательно, является величиной постоянной (коэффициент распределения / С). Этот закон соблюдается только в идеальных условиях (невысокие концентрации, одинаковое агрегатное состояние молекул веществ в обеих фазах). На практике он выполняется лишь с определенной степенью приближения.

Экстракция протекает без осложнений в том случае, когда целевое вещество хорошо растворяется в одном растворителе, а сопутствующие примеси растворяются преимущественно в другом растворителе. В зависимости от того, извлекается ли вещество из жидкой или из твердой фазы, различают и способы выполнения экстракции. Обычную экстракцию вещества из жидкой фазы используют, когда коэффициент распределения больше 100. В этом случае вещество практически целиком переходит в экстрагент в результате однократной экстракции. Здесь вполне подходит операция «встряхивание» (в делительной воронке или аппарате для встряхивания). Когда коэффициент распределения $K < 100$, простая экстракция уже недостаточно эффективна, в этом случае процесс проводят многократно, используя каждый раз чистый экстрагент. Если процесс экстракции необходимо повторить несколько раз, целесообразно использовать специальные приборы для непрерывной экстракции.

На практике чаще всего приходится иметь дело со смесями, компоненты которых имеют близкую растворимость (близкие коэффициенты распределения). Чем меньше различаются их коэффициенты распределения, тем труднее разделить эти вещества путем выполнения обычного «встряхивания», так как каждый раз будет происходить лишь небольшое обогащение экстракта одним веществом по отношению к другому. Возможность разделения двух веществ определяется различием коэффициентов распределения. Мерой возможности разделения двух веществ служит фактор разделения: $\beta = K_1 / K_2$, где β всегда больше 1.

Два вещества удовлетворительно разделяются встряхиванием только в том случае, если $\beta \geq 100$. Для разделения смесей с $\beta < 100$ необходимо многократное повторение операции.

При любом способе экстракции процесс распределения вещества протекает лишь на границе фаз, и, следовательно, для достижения равновесного состояния необходимо обеспечить максимальную площадь контакта. Для этого жидкие фазы встряхивают или пропускают

через пористую пластинку, а твердые образцы перед экстракцией измельчают в тонкий порошок.

Большая площадь контакта двух фаз характерна для распределительной хроматографии. Однако этот метод применяют успешно лишь для разделения небольших количеств вещества.

ПРИБОРЫ ЭКСТРАГИРОВАНИЕ ТВЕРДЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстрагирование проводят в *аппарате Сокслета*. Экстрагирование ведут легкокипящими растворителями (например, петролейным эфиром, дихлорметаном, четыреххлористым углеродом или ацетоном), которые нагревают в круглодонной колбе до кипения (электрическая баня, песчаная баня). Пары проходят через отводную трубку в холодильник Димрота, где конденсируются. Конденсат стекает во вкладыш — патрон из фильтровальной бумаги (в аппарате Сокслета) или на пористую пластинку (в трубке Тиле), где находится экстрагируемый образец. При омывании образца растворителем осуществляется собственно экстракция растворимых компонентов. При этом объем жидкости в аппарате Сокслета увеличивается до тех пор, пока верхний уровень не достигает перегиба сливной трубки, после чего жидкость сливается из насадки вместе с экстрагируемым веществом.

Необходимо, чтобы верхний уровень вкладыша (патрона) на несколько миллиметров превышал перегиб сливной трубки, так как в противном случае возможно вымывание экстрагируемого материала при сливе. На практике экстрагирование проводят в периодическом режиме.

Экстракция плохо растворимых веществ проводится в *аппарате Сокслета специальной конструкции* — аппарате для горячего экстрагирования. От аппарата Сокслета он отличается наличием так называемой «рубашки», по которой поднимаются пары растворителя. Таким образом, образец все время омывается парами растворителя. Свойства выбранного растворителя определяют температуру, при которой происходит экстракция.

Непрерывное экстрагирование проводят в *трубке Тиле*. В ходе процесса через двухпозиционный кран отбирают пробу (например, для анализа или с целью сохранения термолабильных веществ).

ЭКСТРАГИРОВАНИЕ ЖИДКОСТЕЙ

Экстрагирование проводят в *делительной воронке*. Воронку заполняют на 2/3 ее объема. При этом 1/3 объема жидкости составляет рас-

творитель — экстрагент. Например, 200 мл раствора вещества (обычно в воде) и 100 мл растворителя — экстрагента, составляющие в сумме 300 мл, должны встряхиваться в делительной воронке объемом 500 мл.

При использовании легколетучих и легковоспламеняющихся растворителей диэтилового эфира, этилацетата, бензола вблизи места проведения работ не должны находиться горелки с открытым пламенем или включенные нагревательные приборы. Так как некоторые растворители к тому же токсичны или являются канцерогенами, работать необходимо при включенной вытяжной вентиляции в вытяжном шкафу.

Если коэффициент распределения целевого вещества $K < 20$, экстракцию проводят в непрерывном режиме методом барботаж. В этом случае целевое вещество может быть проэкстрагировано небольшим объемом растворителя. В зависимости от плотности используемых растворителей применяют *барботеры* различного типа. Растворитель непрерывно испаряется в круглодонной колбе (электрическая или песчаная баня) и конденсируется в холодильнике Димрота. Конденсат проходит через пористую пластинку, в виде мелких капелек барботирует через экстрагируемый раствор, обогащаясь растворимыми компонентами, и через сливную трубку вновь возвращается в колбу.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Экстрагирование твердых образцов. Работа с аппаратом Сокслета несложна и требует только осторожного обращения с экстрактором при сборке и разборке аппарата.

Экстрагирование жидкостей. В простейшем случае экстрагирование из раствора проводят в делительной воронке.

Кран делительной воронки необходимо смазать несколькими каплями растворителя для экстракции или воды, но не смазкой. Смазку для шлифов в данном случае использовать не рекомендуется, так как она будет растворяться в органическом растворителе и тем самым загрязнять раствор целевого вещества.

После заполнения воронки верхнее горло закрывают пробкой и воронку легко встряхивают. При этом обычно в воронке возникает небольшое избыточное давление паров растворителя.

Для удаления паров растворителя воронку, перевернув вверх и медленно открывают кран, при этом второй рукой удерживают пробку. Кран закрывают, воронку встряхивают в течение 1 мин и вновь повторяют операцию удаления паров.

Для разделения фаз вставляют воронку в кольцо штатива, вытаскивают пробку и оставляют воронку в покое до полного расслоения фаз.

Нижнюю фазу осторожно сливают через кран, верхнюю фазу сливают через горло воронки.

Экстрагирование повторяют трижды. Затем объединенные органические экстракты не менее трех раз промывают водой, контролируя значение рН.

Органическую фазу высушивают, медленно пропуская через слой сульфата натрия или другого осушителя, помещенного в воронку для обычного фильтрования. Раствор вытекает из закрытой сверху делительной воронки в заполненный осушителем фильтр до тех пор, пока конец воронки не окажется ниже уровня жидкости на фильтре; в этот момент раствор прекращает поступать на фильтр. Как только уровень жидкости на фильтре понизится, и воздух попадет в делительную воронку, раствор снова начинает вытекать на фильтр. Процесс повторяется периодически, пока вся жидкость не отфильтруется и одновременно не высушится. В конце процесса осушитель обязательно промывают чистым органическим растворителем во избежание довольно значительных потерь целевого вещества за счет адсорбции его осушителем.

Растворитель выпаривают на роторном испарителе, остаток очищают путем перегонки, кристаллизации или хроматографии.

ИСТОЧНИКИ ОШИБОК ПРИ ЭКСТРАГИРОВАНИИ

Высокие потери вещества в процессе встряхивания с растворителями. Рекомендации: многократное встряхивание с небольшими порциями растворителя эффективнее, чем однократная экстракция большим объемом растворителя.

Длительное расслоение при близкой плотности фаз. Рекомендации: если органическая фаза легче воды, в водную фазу добавляют хлорид натрия, если органическая фаза тяжелее воды, ее следует разбавить чистым растворителем.

Образование эмульсий. Рекомендации: делительную воронку осторожно покачивают, а затем ее выдерживают длительное время с целью лучшего расслоения; иногда фазы расслаиваются быстрее, если отфильтровать всю смесь.

Повышенное избыточное давление в делительной воронке. Возникает за счет выделения CO_2 , если водную кислотную фазу промыть содой или водную щелочную (карбонатсодержащий раствор) кислотой. Рекомендации: воронку осторожно встряхивают в перевернутом состоянии и с открытым краном (!); после полной нейтрализации кислоты (основания), убедившись в прекращении выделения CO_2 , кран закрывают и продолжают встряхивание.

ОШИБКИ ПРИ БАРБОТИРОВАНИИ

При экстракции растворителем меньшей плотности уровень нижней фазы должен находиться ниже уровня сливной трубки, так как при нагревании фазы увеличиваются в объеме.

При экстракции растворителем большей плотности вначале вносят достаточный объем экстрагента, а затем прибавляют экстрагируемый раствор.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Экстракция веществ из твердых органических и неорганических смесей.

Экстракция веществ из органических жидкостей водой (или наоборот) при обработке продуктов синтеза или при подготовке образцов для количественного анализа.

1.6. МЕМБРАННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ

Мембранная фильтрация — процесс селективного выделения веществ при помощи тонкоструктурированных мембран. С помощью давления или слабого вакуума можно проводить процесс в непрерывном (диафильтрация) или периодическом (ультрафильтрация) режимах.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

При диафильтрации объем раствора остается постоянным вследствие непрерывной подачи растворителя, в то время как при ультрафильтрации объем раствора уменьшается и таким образом достигается концентрирование раствора. Для диафильтрации существует следующая зависимость между концентрацией и объемом:

$$\ln(C_o/C_k) = V_k/V_o,$$

где C_o — начальная концентрация, C_k — конечная концентрация, V_k — конечный объем, V_o — начальный объем.

В случае ультрафильтрации зависимость имеет следующий вид:

$$C_k = (V_o/V_p)^n C_o,$$

где V_p — объем после разбавления.

Мембранная фильтрация проводится под давлением, причем в большинстве случаев избыточное давление составляет 0,2–1,5 МПа. В процессе фильтрации раствор хорошо перемешивают, чтобы исключить вероятность возникновения концентрационной поляризации т.е. образования на поверхности фильтра вторичной мембраны — пограничного слоя с более высокой концентрацией анализируемых веществ. Образование вторичной мембраны влечет за собой изменение пределов пропускания и частичный пропуск целевого вещества.

ПРИБОРЫ

Для мембранной фильтрации используют приборы, рассчитанные на различные объемы рабочего раствора: ячейки с дисковыми мембранами и встроенными мешалками объемом 10–1000 мл и ячейки с мембранами в виде полых волокон, рассчитанных на объемы более 1 л. Для изготовления ячеек применяют инертные пластики (оргстекло, поликарбонат, тефлон и др.) и частично — нержавеющую сталь.

Мембранные фильтры представляют собой тонкие пленки с микропористым рабочим слоем, проницаемым для молекул определенных размеров. Мембраны имеют губчатую структуру с объемом пустот до 60–80%.

Мембраны толщиной 50–250 мкм изготавливают из производных целлюлозы, полиамида, поливинилхлорида, полисульфона и тефлона. Чаще всего они построены асимметрично и состоят из высокопористой подложки, которая несет на себе тонкий рабочий слой (50–150 нм). Удерживающая способность мембран характеризуется *номинальной отсекаемой молярной массой* (НОММ). На практике необходимо указывать размер глобулярных частиц, удерживаемых мембраной. Иногда эту величину ошибочно отождествляют с размерами пор мембраны. Номинальный размер означает, что на мембране удерживается лишь 90–98% вещества указанной молярной массы. Значение НОММ зависит не только от молярной массы, но и от формы и заряда молекул, а также от сорбционных свойств мембраны по отношению к целевому веществу. Приводимые в таблицах значения НОММ характеризуют главным образом поведение сферических незаряженных молекул. Вещества равной или большей молярной массы, молекулы которых вытянуты в длину или имеют форму статистического клубка, т.е. являются менее компактными, могут пройти сквозь мембрану. В табл. 1.8 для ряда веществ приведены степени удерживания на мембране UM-10 (Fa. Amicon), НОММ = 104 г · моль⁻¹. Обычно этот параметр указывают просто числом — 10000. В лабораториях используют мембраны

с минимальной НОММ порядка 103–106 г · моль⁻¹. Обычные мембранные фильтры устойчивы при температурах 50–120 °С, а также в кислых и основных средах при рН от 1 до 13 (табл. 1.9).

В зависимости от условий эксплуатации мембраны можно использовать 10–20 раз без заметного изменения воспроизводимости результатов.

В большинстве случаев мембранная фильтрация проводится в водной среде; однако существуют мембраны для работы в органических растворителях.

Мембраны в виде полых волокон представляют собой пучки пористых капилляров с внутренним диаметром 0,2–1,0 мм. Они характеризуются большой рабочей поверхностью, что позволяет быстро обрабатывать большие объемы рабочих растворов. Раствор образца при проведении диафильтрации помещают в стакан, дистиллированная вода или буфер подаются насосом в полые волокна в необходимом направлении.

При ультрафильтрации в полых волокнах циркулирует рабочий раствор, а в стакане собирается фильтрат. Для работы с небольшими объемами растворов применяются мембраны в форме конических вкладышей в центрифужные пробирки.

Таблица 1.8

Степень удерживания веществ с различными молярными массами на мембране UM–10 (Fa. Amicon), НОММ =104 при рабочем давлении 380 кПа

Вещество	Молярная масса, г · моль ⁻¹	Степень удерживания, %	Вещество	Молярная масса, г · моль ⁻¹	Степень удерживания, %
Аланин	89	0	Поливинил пирролидон K15	10000	80
Триптофан	204	0	Декстран T10	10000	90
Сахароза	342	25	Миоглобин	18000	95
Раффиноза	594	50	Химотрипсиноген	245000	98
Инулин	5000	60	Альбумин	67000	98

С мембранными фильтрами следует обращаться крайне осторожно, так как рабочий слой легко повреждается. Рекомендации: использовать пинцеты с тупыми круглыми концами.

При использовании мембран следует руководствоваться рекомендациями фирмы-изготовителя. Общие рекомендации: мембрану следует не менее 1 ч выдерживать в дистиллированной воде, после

чего несколько раз промыть водой в чашке Петри. Условия хранения: в 10%-м этаноле, который следует заменять каждые 2–4 недели.

Таблица 1.9

Совместимость мембран различных типов с растворителями
(*a* — нитроцеллюлоза; *b* — ацетилцеллюлоза; *в* — регенерированная целлюлоза; *г* — политетрафторэтилен)

Растворитель	Тип				Растворитель	Тип			
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>в</i>	<i>г</i>		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>в</i>	<i>г</i>
Ацетонитрил	–	–	+	+	Формальдегид	+	–	–	+
1М раствор аммиака	+	+	+	+	Глицерин	+	+	+	+
Бензол	+	+	+	+	Гексан	+	+	+	+
Изобутанол	–	–	+	+	Гидроксид натрия 6М	–	–	–	+
Хлороформ	+	–	+	+	Изопропанол	+	+	+	+
Дихлорметан	–	–	+	+	Азотная кислота 25%	–	–	+	+
Диэтиловый эфир	–	–	–	–	Растворы солей	+	+	+	+
Диметилформамид	–	–	+	+	Соляная кислота 25%	+	+	+	+
Уксусная кислота 10%	+	–	+	+	Четыреххлористый углерод	+	–	+	+
Уксусная кислота 100%	–	–	–	+	Тетрагидрофуран	–	–	+	–
Этилацетат	–	–	+	+	Толуол	+	+	+	+
Этанол	–	+	+	+	Пероксид водорода	+	+	+	+

Условные обозначения: (+) совместима; (–) несовместима.

Для стерилизации мембраны выдерживают в 5%-м формалине или в 75%-м этаноле 24 ч, затем мембраны несколько раз промывают дистиллированной водой, после чего выдерживают в автоклаве при 120°С в течение 30 мин.

Мембраны сохраняют влажными, так как при высыхании они тотчас садятся.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Приготавливают раствор вещества (рекомендуется 5–10%-ная концентрация), заполняют им ячейку для фильтрации, устанавливают предохранительный клапан.

Нагнетают давление в ячейке и включают магнитную мешалку.

Фильтрацию продолжают до достижения необходимой степени концентрирования или же до полного отсутствия в фильтрате низкомолекулярных компонентов.

Следует строго придерживаться следующего правила: при диафильтрации объем фильтрата должен по крайней мере в 10 раз превышать объем исходного раствора.

После окончания фильтрации отключают мешалку, снимают давление, концентрат отбирают пипеткой. При больших объемах рекомендуется отбирать целевой раствор в круглодонную колбу с помощью вакуумного насоса.

При количественной обработке необходимо определить содержание вещества в концентрате (путем взвешивания сухого остатка, рефрактометрически, спектрофотометрически).

ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Слишком низкая скорость фильтрации из-за высокой концентрации исходного раствора или из-за того, что НОММ мембраны не соответствует молекулярной массе целевого вещества.

Слишком низкое давление или вакуум.

Форма и заряд молекул целевого вещества отрицательно сказываются на проницаемости мембраны (формируется прочный пограничный слой).

ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рабочем журнале указывают количество вещества в концентрате в г/л или %.

Пример: выход 4,5 г (82%, $M > 10^4$, мембранный фильтр XY).

Можно также указать размеры мембраны, объем раствора, объем фильтрата, продолжительность процесса.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Очистка биополимеров и синтетических полимеров от примесей.

Обессоливание растворов и замена буфера.

Концентрирование (наиболее мягкий и энергосберегающий способ удаления растворителя).

Фракционирование макромолекул (каскадный фильтр).

Применение в клиниках: подготовка анализов, концентрирование плазмы, сыворотки, мочи, суспензий вирусов.

Холодная стерилизация (стерилизующая фильтрация): большинство бактерий задерживается на мембранах с диаметром пор 0,2 мкм.

По сравнению с диализом преимуществом мембранной фильтрации являются высокая скорость и эффективность процесса, недостатком — высокая стоимость аппаратуры.

1.7 ДИАЛИЗ И ЭЛЕКТРОДИАЛИЗ

Диализом называется процесс разделения, основанный на диффузии веществ различной молекулярной массы через полупроницаемые мембраны.

Электродиализом называется разделение заряженных частиц при прохождении их через ионообменные мембраны под действием электрического поля.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Процесс разделения при диализе описывается законом диффузии Фика:

$$Dm / dt = - Ddc / dX,$$

где m — количество вещества, диффундирующего в единицу времени, t — время процесса, D — коэффициент диффузии, c — концентрация, X — расстояние

Коэффициент диффузии D зависит от площади мембраны и ее проницаемости для определенного вещества. Количество вещества, диффундирующее через мембрану в единицу времени, прямо пропорционально площади мембраны и концентрационному градиенту.

ПРИБОРЫ

В лаборатории диализ проводят в диализных мешках различных размеров, приготовленных из плоских мембран или диализных трубок.

Диализные трубки имеют следующие параметры:

Ширина, мм 10–75

Диаметр, мм 6, 16, 20, 30, 50

Длина, м 10, 25.

В простейшем диализаторе перемешивание раствора осуществляется при помощи магнитной или механической мешалки. Более сложная установка включает диализные мешки вместимостью от 2 до 200 мл, а камера имеет объем до 10 л.

Мембраны для диализа представляют собой пленки из полимерных материалов, проницаемые для низкомолекулярных веществ (солей, аминокислот, сахаров и др.). Обычно это пленки из ацетилцеллюлозы (например, целлофан), изготовленные в виде трубочек диаметром от 3 до 50 мм и предназначенные для обессоливания веществ с молярной массой от 103 до 5.104 г. моль⁻¹.

Электродиализ проводят в проточном режиме. Раствор образца помещают между двумя электродами, пространство между которыми разделено ионообменными мембранами двух типов. Мембраны, изготовленные из полимерных материалов (полиэфиры, полиэтилен, поливинилхлорид), несут частицы сильного катионита (катионообменная мембрана) или сильного анионита (анионообменная мембрана). В отличие от ионообменных смол, применяемых в хроматографии, мембраны для электродиализа не нуждаются в регенерации. Мембраны хранят во влажном состоянии. При электродиализе процесс идет очень интенсивно, что позволяет за короткий срок обессолить большие объемы рабочего раствора.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Диализную трубку необходимой длины завязывают с одной стороны узлом или перевязывают ниткой.

Перед началом диализа мешок выдерживают не менее 2 ч в воде, после чего тщательно промывают (стадия набухания пленки и удаления пластификатора).

Водный раствор целевого вещества заливают в диализный мешок и входное отверстие завязывают узлом или перевязывают ниткой.

При работе с небольшими объемами для увеличения рабочей площади рекомендуется оба конца трубки закрыть оплавленными стеклянными палочками.

Готовый мешок привязывают ниткой (длиной 5–10 см) к стеклянной палочке и подвешивают в стакане объемом 1–5 л.

Через некоторое время (от одного до нескольких часов) для увеличения эффективности и сокращения времени диализа заменяют воду в стакане.

Диализ ведут до исчезновения в диализате низкомолекулярных компонентов или до достижения необходимой степени чистки (общая продолжительность процесса составляет от нескольких часов до нескольких суток).

Для количественной оценки после окончания процесса содержание вещества в диализном мешке определяют взвешиванием, спектрофотометрически и т. д.

ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Повреждение мембраны (целостность мембраны проверяют с помощью красителей — конго красного, метиленового синего, иельского синего).

Неправильно выбраны диаметр трубки и пористость мембраны.

Плохое перемешивание.

Проницаемость мембраны сильно зависит не только от молекулярной массы, но и от формы и заряда молекул.

ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рабочем журнале приводят данные о количестве вещества образце по завершении диализа в г/л и в% (по результатам взвешивания или определения концентрации в растворе), а также условия электродиализа.

Пример: выход 4,2 г (75%, $M > 2 \cdot 10^3$, диализ, ток 20 А, мембрана ХУ).

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Диализ: разделение низко- и высокомолекулярных веществ; обессоливание растворов полимеров; очистка полимеров (белков, синтетических полимеров и др.); изучение фармацевтических препаратов и биополимеров в процессе их получения.

Электродиализ: удаление солей и ионов металлов из растворов (например, из растворов белков, морской воды); коррекция рН-растворов; концентрирование растворов электролитов.

1.8 ЛИОФИЛИЗАЦИЯ (СУБЛИМАЦИЯ)

Лиофилизация — метод высушивания глубоко замороженных образцов путем возгонки (сублимации) воды в вакууме.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Процесс лиофильной сушки осуществляют в вакууме при пониженных температурах. При температуре выше 273,16 К (0,01 °С) вода может существовать одновременно только в жидком и газообразном состояниях. Фазовый переход из жидкого состояния в газообразное называется испарением. При температуре ниже 273,16 К вода существует только в твердом и газообразном состоянии. Фазовый переход из твердого состояния в газообразное называется сублимацией. Интервал 220–273 К соответствует истинному давлению пара при сублимации. Все три фазовых состояния могут существовать одновременно только при 273,16 К, поэтому эту точку называют «тройной точкой».

Давление паров над поверхностью льда снижается при падении температуры и при 253 К (–20 °С) составляет всего 100 Па. При удалении паров воды из пространства над поверхностью льда или замороженного раствора происходит интенсивное испарение льда. Этот процесс сопровождается потерей части энергии льдом, в результате чего температура льда снижается, и на протяжении всего периода возгонки (сублимации) образец остается в глубоко замороженном состоянии. Температура образца при этом определяется давлением пара над льдом. Для осуществления лиофилизации весьма важно, чтобы на протяжении всего процесса в установке поддерживалось низкое давление.

Низкое давление поддерживают, при помощи ротационного масляного насоса. Однако этот процесс экономически нерентабелен, так как образующийся водяной пар занимает слишком большой объем. Наиболее эффективной ловушкой паров воды служит конденсатор льда, имеющий развитую, сильно охлаждаемую поверхность. В этом случае конденсация водяных паров идет эффективно и давление над образцом сохраняется достаточно низким. Вакуумный насос служит только для удаления небольших количеств воздуха из образца или воздуха, просачивающегося в систему за счет отдельных неплотностей. Для поддержания необходимого давления используют также масляный насос. Процесс высушивания протекает быстро, если парциальное давление неконденсируемого газа (воздушной смеси) не превышает 100 Па. При давлении выше 100 Па молекулы воды имеют ограниченную подвижность, процесс лиофилизации затруднен. При давлении 1 Па процессы испарения воды из образца и ее конденсации в ловушке протекают равномерно.

Скорость лиофильного высушивания зависит не только от давления паров, которое должно поддерживаться на минимальном уровне. Большое значение имеет компенсация энергии, затраченной на сублимацию льда. Это обеспечивается прямым контактом, обогревом путем облучения, конверсией. Процесс лиофилизации вещества подразделяется на три этапа: замораживание образца до температуры, определяемой остаточным давлением в системе; возгонка; подсушивание образца.

Основной процесс — возгонка начинается, как только в испарителе достигается рабочий вакуум (остаточное рабочее давление). Процесс заканчивается при полном испарении льда. Подсушивание образца необходимо только в том случае, если последний имеет слишком высокую остаточную влажность, нежелательную при последующем хранении. В этом случае образец высушивают с использованием диффузионного насоса (~ 10 Па) или над P₂O₅ в вакууме.

ПРИБОРЫ

Лиофилизацию проводят в специальных приборах, которые состоят из нескольких функциональных блоков.

Камера для образца. Образцы размещают в лотках, чашках и др. емкостях, стоящих на полке. Полку можно нагревать (нагреватель с плавной регулировкой нагрева) или охлаждать. Камера имеет насадку («зонтик»), на которой можно разместить множество круглодонных колб. Эти колбы отличаются от обычных круглодонных колб тем, что вместо конического шлифа имеют сферический внешний шлиф-кern. Такая конструкция исключает загрязнение образца вакуумной смазкой при извлечении высушенного вещества из колбы.

Конденсатор (охлаждаемая ловушка). Наиболее эффективным конденсатором водяных паров является охлаждаемая извне поверхность. От степени охлаждения конденсатора зависит парциальное давление паров воды и, как следствие, остаточная влажность препарата. Емкость конденсатора определяется площадью охлаждаемой поверхности. В зависимости от конструкции ловушки объемы высушиваемых образцов варьируются от 50 до 200 мл.

Холодильный агрегат. Только в небольших лабораторных установках конденсатор (ловушку) замораживают охлаждающей смесью — жидким азотом или сухим льдом. На предприятиях применяют холодильные агрегаты, которые делают возможным непрерывное производство. Во многих случаях используют одноступенчатые холодильники (максимальное охлаждение до 230 К). Для более глубокого замораживания используют двухступенчатые агрегаты, способные поддерживать температуру ниже 200 К. Холодильные агрегаты должны иметь достаточно высокую производительность, чтобы при высокой скорости возгонки обеспечивать быструю конденсацию и замораживание водяных паров.

Вакуумный насос. Небольшое количество водяных паров не улавливается охлаждаемой ловушкой. Эти пары и всегда имеющиеся в системе сопутствующие газы должны удаляться ротационным насосом с достаточно высокой, производительностью. Большинство установок снабжены дополнительным диффузионным масляным насосом, с помощью которого осуществляют досушивание (при отключенной ловушке) образца.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Способ замораживания и необходимая температура лиофилизации зависят от свойств высушиваемых веществ, а также от размера

и формы сосуда для лиофилизации. Некоторые вещества могут быть высушены уже при 260 К, другие, с более высоким содержанием солей, при 230 К.

Образец может быть лиофилизован в круглодонных колбах или в открытых сосудах.

Колбы для лиофилизации отличаются от обычных круглодонных колб тем, что вместо конического шлифа имеют сферический внешний шлиф-кern. Такая конструкция исключает загрязнение образца вакуумной смазкой при извлечении высушенного материала из колбы.

Перед замораживанием колбу с образцом прикрывают бумажной салфеткой, чтобы воспрепятствовать уносу высушенного вещества в конденсатор.

При лиофилизации фиксируют салфетку в керне упругой пружинкой и избыточный материал обрезают.

В случае использования лотков, чашек, стаканчиков, пробирок салфетка прикрепляется липкой лентой. Сосуд можно также закрыть термопластичной пленкой парафильм, в которой затем проделывают сеть тонких отверстий с помощью иглы.

Замораживание образца проводят в бане с хладоагентом (жидкий азот, ацетон — сухой лед) или непосредственно в камере.

Ампулы или чашки заполняют слоем раствора толщиной не более 2 см, после чего их устанавливают на полку камеры и там охлаждают до 240К.

Круглодонные колбы с образцом вращают на рамках или валках и одновременно охлаждают. При этом раствор равномерно распределяется тонким слоем по стенкам сосудов. О полном замораживании свидетельствует потрескивание слоя льда.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ ОПЕРАЦИЙ

Устанавливают сосуды и чашки в камеру. После снижения давления до 100 Па круглодонные колбы закрепляют на насадке («зонтик»)

Круглодонные колбы с замороженными образцами присоединяют вращательным движением к кернам «зонтика», слегка прижимают (перед этим шлиф необходимо тщательно очистить и правильно смазать), а затем открывают кран на керне. Колбы удерживаются на керне самостоятельно лишь после вакуумирования. Перед тем как присоединить очередную колбу, необходимо убедиться, что в закрепленных колбах достигнута температура возгонки, по этому признаку судят о глубине вакуума в системе.

Начало лиофилизации можно проконтролировать через некоторое время следующим образом: при помощи запорного крана отключают

камеру-испаритель от ловушки. Через некоторое время (несколько секунд) определяют уровень давления в испарителе. В начале лиофилизации давление немного повышается, или при нормальном течении процесса несколько падает и после завершения сушки практически не изменяется.

По окончании лиофилизации систему (осторожно!) разгерметизируют и разбирают. Сосуд с образцом герметично закрывают или помещают в эксикатор, поскольку тонкодисперсные лиофилизованные препараты часто бывают гигроскопичны и расплываются на воздухе.

При необходимости образец дополнительно высушивают в рабочей камере. Для этого перед включением диффузионного насоса камеру отключают от конденсатора. Менее эффективным, но более часто встречающимся приемом является подсушивание образца над P_2O_5 в вакуум-эксикаторе.

ОСОБЫЕ СЛУЧАИ

Нерастворимые в воде твердые вещества методом лиофильного высушивания часто удается перевести в порошкообразное состояние. Этот прием чрезвычайно удобен при работе с ультрамикрочислом вещества. Вначале вещество растворяют в минимальном объеме н-бутанола, затем добавляют 2–3-кратный объем воды и быстро замораживают. После лиофилизации вещество представляет собой тонкодисперсный порошок.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Мягкое высушивание лабильных веществ с сохранением их свойств (структуры, ферментативной активности, бактериостатических свойств).

Работа с ультрамикрочислами вещества.

Возможность длительного сохранения лиофильно высушенных образцов.

Применение в области клинических исследований: препараты ферментов, бумага и трубки для тестирования, плазма крови, препараты белков, антигены, антитела, гормональные препараты.

Применение в биохимии: белки и нуклеиновые кислоты.

Применение в химии: природные вещества и полимеры.

Применение в области гигиены и бактериологии: душистые вещества, антитоксины, антитела, сыворотки, препараты для определения группы крови, бактериальные культуры.

Применение в пищевой промышленности: сублимированные продукты, такие как чай, кофе, молоко, супы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ И ЗАДАНИЯ К ГЛАВЕ 1

1. Какие методы используются для получения чистых веществ?
2. Почему применяется множество экспериментальных приемов для очистки веществ, какие важнейшие свойства при этом используются?
3. Какие из перечисленных методов позволяют очищать вещества от микробных загрязнений? Какие от химических примесей?
4. Можно ли данные методы использовать в промышленности?
5. Предложить схему очистки вещества до степени чистоты 99% с целью его последующего использования в качестве референс-стандарта.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 1

Техника лабораторных работ: уч. пособие для студентов, обучающихся по специальности 020101.65 «Химия» и по направлению 240401.62 «Химическая технология и биотехнология» / сост. О. С. Авдякова. — Тольятти: ТГУ, 2010. — 84 с.

Неклюдов, А. Д., Иванкин, А. Н., Федотов, Г. Н. Практический курс по общей химии, биотехнологии и экологическим основам производства: Учебное пособие для студентов спец. 260300. — М.: МГУЛ, 2004. — 500 с.

Березин, Б. Д. Органическая химия. В 2 томах. Том 1. Учебник / Б. Д. Березин, Д. Б. Березин. — М.: Юрайт, 2016. — 314 с.

Алексеев, В. А. Металлы в окружающей среде. Оценка эколого-геохимических измерений. Сборник задач / В. А. Алексеев, А. В. Суворинов, Е. В. Власова. — М.: Логос, 2012. — 170 с.

Грандберг, И. И. Практические работы и семинарские занятия по органической химии / И. И. Грандберг, Н. Л. Нам. — М.: Юрайт, 2012. — 352 с.

Глава 2

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРОЦЕДУРАХ АНАЛИТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

Отбор проб проводят, как правило, в соответствии с нормативными или техническими документами на конкретные виды продуктов.

При наличии большого технического или промышленного образца, который не может быть взят в анализ целиком, проводят равномерный отбор проб по всему объему образца. Отбирают равными порциями из верхнего, нижнего и среднего слоев упаковки или емкости.

При отборе проб необходимо соблюдать вопросы техники безопасности, связанные с наличием запаха, токсичности, химической или биологической активности.

В ряде случаев необходимо соблюдать специальные условия, например при необходимости отбора проб в асептических условиях, для обеспечения микробиологической чистоты.

Количество пробы определяется из конкретного метода определения. Представительная проба по массе должна обеспечивать двух или трехкратную повторяемость аналитической процедуры, а также контрольного количества для последующего длительного хранения в случае возникновения спорных вопросов по результатам анализа.

ИЗМЕЛЬЧЕНИЕ ПРОБЫ

В случае применения разрушающих образец методов аналитического исследования пробу измельчают на гомогенизаторе. Конструкция гомогенизатора должна позволять осуществлять максимальное диспергирование образца, поскольку его последующее растворение или экстрагирование протекает тем эффективнее, чем мельче размер получаемых частиц.

При этом температура пробы должна быть не более 25 °С.

Различают *диспергирование*, как измельчение, дробление. Под *гомогенизацией* понимают равномерное распределение частиц одного веще-

ства в другом. Одновременно с диспергацией, обычно происходит гомогенизация, измельченная фаза равномерно распределяется в среде. При гомогенизации обычно дробятся крупные комочки на более мелкие.

Простейшим измельчителем является обыкновенная ступка с пестиком, в которую насыпают образец и подвергают его растиранию. Для слипающихся, гигроскопичных или мажущих образцов применяют растирание вместе с инертным кварцевым песком, частицы которого не будут искажать результаты анализа.

В аналитической практике измельчение проводят с использованием шаровых или маятниковых дробилок. Наиболее эффективными являются ножевые диспергаторы типа обыкновенных кофемолок. Скорость вращения раздробляющих и измельчающих образец ножей на валу мешалки может составлять от нескольких до нескольких тысяч оборотов в минуту.

Подготовленную пробу хранят, как правило, не более 24 ч в герметически закрытом контейнере таким образом, чтобы предотвратить порчу и изменение состава.

При необходимости допускается хранить подготовленную пробу в замороженном состоянии при температуре не выше минус 18 °С не более 7 сут.

ИЗВЛЕЧЕНИЕ АНАЛИТА ИЗ ОБРАЗЦА ЭКСТРАКЦИЕЙ

Большинство аналитических методов является разрушающим образцом процессом и представляет собой процедуру извлечения анализируемого вещества из поврежденной или полностью нарушенной матрицы образца. При этом сама матрица, как правило, подвергается необратимому разрушению.

Более того, большинство извлекаемых, особенно крупных молекул, типа белков или полисахаридов, могут быть извлечены только фрагментарно. Т.е. в процессе извлечения получают некие остатки молекулы, которые и анализируются.

Цель экстрагирования образца заключается в максимально полном извлечении аналита и переводе его в раствор для последующего количественного анализа.

Используют растворитель или смесь растворителей, в котором хорошо растворяется извлекаемое вещество.

Наиболее полное экстрагирование достигается в аппаратах Сокслета, которые за 4–6 часов вымывания аналита кипящим растворителем переводят в раствор более 99% содержащегося вещества. Данный тип экстрагирования может иметь ограничения из-за использования

растворителя при температуре его кипения, составляющую, как правило 50–100 °С.

На практике часто применяют экстракцию при комнатной температуре. Для этого 1 часть вещества заливают 2–10 частями (объемами) растворителя, выступающего в качестве экстрагента. Процесс экстракции при стоянии, переменном покачивании или перемешивании заполненной емкости осуществляют в течение 1–24 часов. При этом достигается равновесное извлечение аналита в раствор. Как правило, извлекается более половины содержащегося в матрице аналита.

Для повышения степени извлечения используют двух- или трехкратное повторение.

Однократный процесс извлечения органических соединений, например пестицидов, из матриц хорошо растворяющим их растворителем (ацетон, гексан, хлороформ) при соотношении образец: растворитель 1: 2 за 8 ч экстрагирования на лабораторном столе позволяет извлечь 60–80% вещества, повторное экстрагирование этой же матрицы дает еще 10–15%. Троекратное повторение позволяет извлечь еще 5–7% вещества.

Процесс извлечения аналита из пробы образца, поступающей на анализ, является важнейшим этапом, влияющим на точность ответа на вопрос «сколько данного вещества в процентах или г (мг) на г (кг, т) содержится в пробе?».

Поэтому, при разработке метода конкретного анализа, используют прием принудительного загрязнения пробы точно известным количеством вещества, которое будут анализировать. Проводят процедуру извлечения введенного вещества и устанавливают степень извлекаемости. Подбирают условия для наиболее полного извлечения.

В случае, когда полное извлечение введенного вещества данной методикой не достигается, а смена самой методики невозможна, в окончательных расчетах применяют повышающий коэффициент, учитывающий реальную степень извлечения из данной конкретной матрицы исследуемого образца. Например 1,1 или 1,2.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ И ЗАДАНИЯ К ГЛАВЕ 2

1. Какие методы используются для подготовки проб в аналитической химии?
2. Почему необходимо при определении содержания индивидуального вещества в образце измельчать всю пробу, а не ее часть?
3. Условия хранения проб?
4. Условия транспортировки лабильных образцов?

5. Какими способами можно измельчить пробу.
6. Приемы экстракции определяемого вещества из образца.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 2

Лисицын, А. Б., Иванкин, А. Н., Неклюдов, А. Д. Методы практической биотехнологии. М.: ВНИИМП, 2002. — 402 с.

Неклюдов, А. Д., Иванкин, А. Н., Федотов, Г. Н. Практический курс по общей химии, биотехнологии и экологическим основам производства: Учебное пособие для студентов спец. 260300. — М.: МГУЛ, 2004. — 500 с.

Карпов, Ю. А., Савостин, А. П. Методы пробоотбора и пробоподготовки. — М.: Бином; Лаборатория знаний, 2003. — 243 с.

Дерффель, К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир — 1994. — 267 с.

Другов, Ю. С., Родин, А. А., Кашмет, В. В. Пробоподготовка в экологическом анализе. — М.: Изд-во Лаб-Пресс, 2005. — 756 с.

Глава 3

АНАЛИЗ ВОДНЫХ СИСТЕМ

В состав всех продуктов, материалов и живых организмов входит связанная вода, количество которой составляет от нескольких процентов, до 70–90% влагосодержания в живой ткани млекопитающих, микроорганизмов и жидких систем.

Исходный химический состав воды предопределяет экология, которая обуславливает попадание во все материалы как самой воды, используемой для питья, так и ее примесей.

В соответствии с требованиями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) установлены нормативы содержания разнообразных веществ в питьевой воде, причем их концентрация в идеале не должна превышать определенных величин ПДК.

Так, нормативами ВОЗ допускается содержание в питьевой воде следующих примесей в количествах, мг/л, не более: акриламида — 0,0005; алахлора — 0,02; алюминия — 0,2; альдикарба — 0,01; альдрина — 0,00003; аммония — 0,2; атразина — 0,002; бария — 0,7; бенз(а)пирена — 0,0006; бензатона — 0,03; бензола — 0,0007; бора — 0,3; броматов — 0,025; бромдихлорметана — 0,06; бромформа — 0,1; винилхлорида — 0,01; гексахлорбензола — 0,001; гексахлорбутадиена — 0,005; гептахлора — 0,00003; ДДТ — 0,002; дибромацетонитрила — 0,1; 2-дибром-3-хлорпропана — 0,001; дибромхлорметана — 0,1; дихлорацетонитрила — 0,09; 1,2-дихлорбензола — 0,001; 1,4-дихлорбензола — 0,0003; дихлорметана — 0,02; дихлорпропа — 0,1; 1,2-дихлорпропана — 0,02; 1,3-дихлорпропена — 0,02; дихлоруксусной кислоты — 0,05; 2,4-дихлорфеноксимасляной кислоты — 0,09; 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты — 0,009; 2,4-дихлорфенола — 0,0003; 1,2-дихлорэтана — 0,03; 1,2 — дихлорэтилена — 0,05; ди(2-этилгексил)адипината — 0,08; ди(2-этилгексил)фталата — 0,008; железа — 0,3; кадмия — 0,003; ксилола — 0,02; линдана — 0,002; марганца — 0,1; меди — 1; 2-метил-4-хлорфеноксиуксусной кислоты — 0,002; метоксихлора — 0,02; метолахлора — 0,01; молибдена — 0,07; молината — 0,006; монохлорамина — 3;

моноклорбензола — 0,01; мышьяка — 0,01; натрия — 200; никеля — 0,02; нитратов — 50; нитритов — 3; нитрилотриуксусной кислоты — 0,2; пентиметалина — 0,02; пентахлорфенола — 0,009; перметрина — 0,02; пиридата — 0,1; пропанила — 0,02; ртути — 0,001; свинца — 0,01; селена — 0,01; сероводорода — 0,05; сильвекса — 0,009; симазина — 0,002; стирола — 0,004; сульфатов — 250; сурьмы — 0,005; 2,4,5-Т — 0,009; текопропа — 0,01; тетрахлорэтилена — 0,04; толуола — 0,02; тригалометана — 0,001; трифлуралина — 0,02; трихлорацетальдегида — 0,01; трихлорбензола — 0,005; трихлортрибутилоловоксида — 0,002; трихлоруксусной кислоты — 0,1; 2,4,6-трихлорфенола — 0,002; 1,1,1-трихлорэтана — 2; трихлорэтилена — 0,07; формальдегида — 0,9; фтора — 1,5; хлора — 0,6; хлордана — 0,0002; хлоридов — 250; хлоритов — 0,2; хлортолурана — 0,03; 2-хлорфенола — 0,0001; хлорциана — 0,07; хрома — 0,05; цианидов — 0,07; цинка — 3; четыреххлористого углерода — 0,002; эпихлоргидрина — 0,0004; ЭДТА — 0,2; этилбензола — 0,002. Показатель кислотности pH 6,5–8,5. Микроорганизмы термотолерантные и другие колиформы не должны обнаруживаться в 100 мл пробы.

Эти показатели формируют токсикологическую безопасность воды и ее органолептические и потребительские качества. Превышение содержания любого из перечисленных веществ увеличивает токсическую опасность использования воды, либо ухудшает её вкусовые качества.

Нормативные требования к качеству питьевой воды в Российской Федерации установлены в соответствии с требованиями государственных стандартов. По отдельным показателям в нашей стране существуют более высокие по сравнению с требованиями ВОЗ разрешенные уровни содержания веществ, что обусловлено реально сложившимися геологическими и экологическими условиями.

Показатели содержания химических веществ в воде для контроля миграции вредных химических веществ из материалов и реагентов, применяемых в практике хозяйственно-питьевого водоснабжения, по которым в России производится контроль за качеством воды таковы (мг/л): общая минерализация (сухой остаток) 1000; жесткость общая 7,0 (мг-экв./л); нефтепродукты, суммарно 0,1; поверхностно-активные вещества (ПАВ) анионоактивные 0,5; алюминий (Al^{3+}) 0,5; аммиак (по азоту) 2,0; барий (Ba^{2+}) 0,7; бериллий (Be^{2+}) 0,0002; бор (В, суммарно) 0,5; ванадий 0,1; висмут 0,1; вольфрам 0,05; железо (Fe, суммарно) 0,3; кадмий (Cd, суммарно) 0,001; кобальт 0,1; кремний 10,0; литий 0,03; марганец (Mn, суммарно) 0,1; медь (Cu, суммарно) 1,0; молибден (Mo, суммарно) 0,25; мышьяк (As, суммарно) 0,05; натрий (Na^+) 200,0; никель (Ni, суммарно) 0,1; ниобий (Nb) 0,01; ртуть (Hg, суммарно) 0,0005; свинец (Pb, суммарно) 0,03; селен (Se, суммарно) 0,01; серебро (Ag^+)

0,05; стронций (Sr^{2+}) 7,0; сурьма 0,05; таллий 0,0001; титан 0,1; фосфор элементарный 0,0001; хром (Cr^{6+}) 0,05; хром (Cr^{3+}) 0,5; цинк (Zn^{2+}) 5,0; бромид (Br^-) 0,2; гексанитрокобальтиатион 1,0; гидросульфидион 3,0; нитраты (по NO_3^-) 45; нитрит (NO_2^-) 3,0; перекись водорода (водорода пероксид) 0,1; персульфат-ион 0,5; перхлорат-ион 5,0; полифосфаты (по PO_4^{3-}) 3,5; сероводород (водорода сульфид) 0,003; сульфаты (SO_4^{2-}) 500; хлоратион 20,0; роданид-ион 0,1; ферроцианид-ион 1,25; фториды (F^-) 1,5; хлориды (Cl^-) 350; хлоритион 0,2; цианиды (CN^-) 0,07; акриламид (пропенамид, кислота акриловая, амид) 0,0001; акриловая кислота 0,5; акрилонитрил 2,0; ацетальдегид 0,2; ацетон (пропан-2-он) 2,2; ацетофенон 0,1; бензальдегид 0,003; бенз(а)пирен 0,00001; бензилхлорид 0,001; бензол 0,01; бутадиен (дивинил) 0,05; бутилакрилат (бутиловый эфир акриловой кислоты) 0,01; бутилацетат 0,1; винилацетат 0,2; винил хлористый (винилхлорид, хлорэтилен) 0,005; гексаметилендиамин (1,6-диаминогексан) 0,01; гидрохинон (1,4-диоксибензол) 0,2; диаллилдиметиламмоний хлорид (ДАДМАХ) 0,1; дибутилфталат 0,2; диметиламин 0,1; диметилтерефталат 1,5; диметилфталат 0,3; диоктилфталат 1,6; дихлорбензол 0,002; дихлорметан (метиленхлорид, хлористый метилен) 0,02; 1,3-дихлор-2-пропанол 1,0; дифенилолпропан (4,4'-изопропилидендифенол) 0,01; дициклопентадиен 0,015; ди(2-этилгексил)фталат 0,008; диэтилентриамин 0,2; диэтилфталат 3,0; изопрен 0,005; изопропилбензол (кумол) 0,1; е-капролактамы 1,0; каптакс (2-меркаптобензтиазол) 5,0; ксилол (диметилбензол) 0,05; метилакрилат (метиловый эфир акриловой кислоты) 0,02; метилацетат 0,1; метилметакрилат (метиловый эфир метакриловой кислоты) 0,01; альфа-метилстирол ((1-метилвинил) бензол) 0,1; спирт бутиловый (бутан-1-ол, пропилкарбинол) 0,1; спирт изобутиловый 0,15; спирт изопропиловый 0,25; спирт метиловый (метанол) 3,0; спирт пропиловый 0,2; стирол (винилбензол) 0,02; тиурам Д (тетраметилтиурамдисульфид) 1,0; толуол (метилбензол) 0,5; триметиламин 0,05; триэтанолламин 1,0; фенол (гидроксibenзол) 0,001; формальдегид (метаналь) 0,05; хлорбензол 0,02; эпихлоргидрин (1-хлор-2,3-эпоксипропан) 0,0001; этилацетат 0,2; этилбензол 0,002; этилендиамин (1,2-диаминоэтан) 0,2; этиленгликоль (этан-1,2-диол) 1,0; микроорганизмов — не более 100 в 1 мл, включая *E. coli* — не более 3.

Гигиенические требования к качеству питьевой воды предусматривают содержание вредных примесей (мг/л), не более: общая минерализация — 1000 (1500); перманганатная окисляемость (ХПК) — 5; нефтепродукты суммарно — 0,1; ПАВ — 0,5; фенольный индекс — 0,25; алюминий — 0,5; барий — 0,1; бериллий — 0,0002; бор — 0,5; железо — 0,3 (1,0); кадмий — 0,001; марганец — 0,1 (0,5); медь — 1; молиб-

ден — 0,25; мышьяк — 0,05; никель — 0,1; нитраты — 45; ртуть — 0,0005; селен — 0,01; свинец — 0,03; стронций — 7; сульфаты — 500; фториды 1,2–1,5; хлориды — 350; хром — 0,05; цианиды — 0,035; цинк — 5; гексахлорциклогексан — 0,002; ДДТ — 0,002; 2,4Д — 0,03; хлор свободный — 0,3–0,5; хлор связанный 0,8–1,2; хлороформ — 0,2; озон — 0,3; формальдегид — 0,05; полиакриламид — 2,0; кремневая кислота — 10; полифосфаты — 3,5. Общая жесткость — 7 (10) ммоль/л; pH 6–9. Содержание термотолерантных колиформных бактерий, общих колиформных бактерий, колифагов — отсутствие в 100 мл; спор сульфитредуцирующих клостридий — отсутствие спор в 20 мл; цист лямблий — отсутствие в 50 мл; общее микробное число в 1 мл — не более 50. Установлены также гигиенические нормы содержания еще более 1300 веществ, количество которых должно находиться в пределах от 0,001 до 200 мг/л.

Гостированные требования к качеству очищенной (дистиллированной) воды составляют (мг/дм³): остаток после выпаривания < 5; массовая концентрация аммиака и аммонийных солей < 0,02; нитратов < 0,2; сульфатов < 0,5; хлоридов < 0,02; алюминия < 0,05; железа < 0,02; кальция < 0,8; меди < 0,02; свинца < 0,05; цинка < 0,2; веществ, восстанавливающих KMnO₄ < 0,08; pH 5,4–6,6; удельная электропроводность при 20 °C < 0,05 См/м.

Типичные результаты анализа речной воды, выполненного методом ионной хроматографии и атомно-абсорбционной спектроскопии свидетельствуют, что по многим неорганическим компонентам неочищенная речная вода средней полосы России не превышает пределов, допущенных отечественными нормативами (мкг/л): алюминий — 31; сурьма — 0,12; мышьяк — 0,7; барий — 13; бериллий — 0,005; кальций — 6000; кадмий — 0,01; кобальт — 0,03; медь — 1,3; хром — 0,3; железо — 100; свинец — 0,09; магний — 1600; марганец — 4; молибден — 0,2; никель — 0,8; калий — 700; натрий — 2000; цинк — 1. Однако по микробиологическим показателям и отчасти по жесткости, определяемой суммой ионов кальция и магния, эта вода нуждается в соответствующей очистке при использовании в качестве питьевой.

3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОДЫ В ОБРАЗЦЕ. ЭТАЛОННЫЙ МЕТОД ИСО

Определение влагосодержания осуществляют по уменьшению массы навески в результате нагревания образца при температуре, обеспечивающей полное испарение воды.

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Весы лабораторные общего назначения с погрешностью взвешивания ±0,0002 г. Термостат с регулируемой температурой нагрева 20–150 °C. Щипцы тигельные. Инертная чаша. Стеклопалочка. Мясорубка или измельчитель ткани. Эксикатор с осушителем силикагелем или прокаленным хлоридом кальция.

Кварцевый песок с частицами диаметром 0,25–1,4 мм, промытый водой, прокипяченный с 17%-ной HCl до исчезновения желтой окраски. Кислота соляная хч, 17%-ный раствор.

ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

Анализируемый образец измельчают в условиях, исключающих потерю влаги (при температуре 25 °C), например мясные продукты дважды пропускают через мясорубку.

К навеске испытуемого образца в количестве 5 г добавляют для улучшения влагоиспарения 15 г подготовленного песка.

Перед использованием, фракцию песка с частицами диаметром 0,25–1,4 мм промывают водой, кипятят с 17%-ной HCl до исчезновения желтой окраски, отмывают дистиллированной водой от хлоридных ионов, высушивают при 150 °C и хранят в эксикаторе над слоем осушителя (активного силикагеля).

Для получения точных результатов до начала измерения, взятый песок прогревают при температуре 103 °C в течение 0,5 ч в инертной чашке со стеклопалочкой, измеряют массу чашки, палочки и песка, охлажденных до комнатной температуры в эксикаторе, добавляют анализируемый образец, определяют с точностью до 0,001 г его массу, перемешивают образец, подвергают высушиванию до постоянной массы в течение 2 ч при температуре (103 ± 2)°C, охлаждают в осушающем эксикаторе до комнатной температуры и определяют массу сухого образца.

Содержание влаги (w, % масс.) рассчитывают:

$$w = (g_1 - g_2) / (g_1 - g_0) \times 100,$$

где g₀ — масса чашки с палочкой и песком, г; g₁ — масса чашки с навеской влажной пробы, с палочкой и песком, г; g₂ — масса чашки с навеской высушенной пробы, с палочкой и песком, г.

Результат содержания влаги представляют округленным до первого десятичного знака. Сходимость определения одной и той же про-

бы при повторении составляет не более $\pm 0,6\%$. Воспроизводимость отклонений результатов анализа в различных лабораторных условиях составляет величину не более $0,8\%$.

3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH. ЭТАЛОННЫЙ МЕТОД ИСО

Водородный показатель (рН) указывает на кислотность системы и представляет величину отрицательного логарифма концентрации ионов H^+ в водной среде ($-\lg [H^+]$). Шкала рН, определяемая ионным произведением воды, обычно обозначается для реальных растворов от 0 до 14. рН < 7 среда кислая, рН > 7 среда щелочная, для нейтральной среды рН = 7, область рН 6,5–7,5 считается близкой к нейтральной.

Вещества в окружающей среде обладают способностью изменять рН водных растворов. Оптимальное существование живых организмов обеспечивается в узком интервале рН, как правило, близким к нейтральному. Большинство химических реакций, а также реакций, протекающих в живых организмах под воздействием ферментов, требует строго определенных значений рН. Величина рН пищевых продуктов, как правило, не должна существенно отличаться от области нейтральных значений рН, однако компонентный состав пищи весьма различается, поэтому наблюдаемые значения рН могут находиться в достаточно широком интервале.

Поскольку при хранении в продуктах питания продолжают биохимические реакции составных компонентов между собой и с веществами окружающей среды (вода, кислород, свет), а также развивается деятельность микроорганизмов (микробное загрязнение, например грибной плесенью), определяемая величина рН может служить показателем качества (свежести) продукта. Сильное нарушение кислотности (щелочности) из-за смешивания с закисленными или щелочными компонентами может представлять опасность для человека.

Сущность инструментального метода измерения рН заключается в определении разности электрического потенциала между стеклянным и электродом сравнения, помещенными в раствор или непосредственно в образец.

ОБОРУДОВАНИЕ

Лабораторный рН-метр с ценой деления шкалы 0,1 единицы рН или цифровой рН-метр с точностью определения 0,01 единицы рН. Стеклянный электрод, сохраняют погруженным в дистиллированную

воду. Электрод сравнения, например каломельный или хлорсеребряный, заполненный насыщенным раствором КСl; электрод сохраняют в насыщенном растворе КСl. Допускается использование совмещенного в одном комбинированного электрода, типа «Orion, Ingold или Radiometer». Мясорубка или измельчитель ткани. Химические стаканы вместимостью 100 мл. Фильтровальная бумага. Мерные колбы вместимостью 1000 мл. Сушильный шкаф с регулируемой температурой 20–150 °С. Весы аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г.

РЕАКТИВЫ

Соляная кислота хч, 0,1 М раствор НСl, имеющий рН 1,1 при 20 °С; готовят из фиксаля.

Буферный раствор рН 4,00 при 20 °С, готовят растворением навески 10,211 г предварительно высушенного до постоянной массы при 125 °С гидрофталата калия $KHC_6H_4(COO)_2$ в мерной колбе вместимостью 1000 мл в 900 мл воды при 20 °С и доводят объем раствора водой до метки. рН раствора составляет 4,00 при 10 °С и 4,01 при 30 °С. Срок хранения буферного раствора при 4 °С — 1 месяц.

Буферный раствор рН 5,45 при 20 °С, готовят смешиванием 500 мл 0,2 н. раствора лимонной кислоты $HOOCCH_2C(COOH)(OH)CH_2COOH$, ММ 192,13 с 375 мл 0,2 М раствора гидроксида натрия, водные растворы смешивают и получают буферный раствор с рН 5,42 при 10 °С и 5,48 при 30 °С. Срок хранения буферного раствора при 4 °С — 1 месяц.

Буферный раствор рН 6,88 при 20 °С, готовят растворением навески 4,402 г предварительно высушенного до постоянной массы при 103 °С в течение не менее 3 ч дигидрофосфата калия KH_2PO_4 и навески 3,549 г гидрофосфата натрия Na_2HPO_4 , предварительно высушенного до постоянной массы при 103 °С (при использовании кристаллогидрата $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ делают перерасчет), в мерной колбе вместимостью 1000 мл в количестве 900 мл воды при 20 °С и доводят объем раствора водой до метки. рН раствора составляет 6,92 при 10 °С и 6,85 при 30 °С. Срок хранения буферного раствора при 4 °С — 7 сут.

Боратный буферный раствор рН 9,18 при 20 °С, готовят из фиксаля. Срок хранения буферного раствора при 4 °С — 1 месяц.

Вода дистиллированная. Этиловый спирт 95%, ректификат. Диэтиловый эфир чда, насыщенный водой.

ПОДГОТОВКА К ОПРЕДЕЛЕНИЮ

рН-метр подготавливают к работе в соответствии с техническим описанием.

Калибровку рН-метра проводят, используя буферный раствор с близким по значению рН к определяемой величине при температуре анализируемого образца (раствора). При использовании достаточно широкого интервала изменений рН проводят калибровку рН-метра в нижней части шкалы при рН 1,1–4,0; в верхней части шкалы при рН 6,88 и в средней части шкалы. При необходимости измерений рН в сильно щелочной области проводят калибровку с использованием соответствующих буферных растворов, например боратного буфера с рН 9,18.

Если рН-метр не снабжен регулятором температуры, то температура буферного раствора должна быть равна 20 °С.

ОЧИСТКА ЭЛЕКТРОДОВ

После определения электроды протирают ватой, смоченной эфиром, затем спиртом, затем отмывают водой и хранят в свежей дистиллированной воде.

При сильном загрязнении солями электроды выдерживают сутки в 1 М растворе соляной кислоты, затем последовательно промывают их дистиллированной водой, 1М раствором гидроксида натрия, отмывают дистиллированной водой, повторяя промывку 2–3 раза, окончательно отмывают дистиллированной водой до характерного для используемой воды значения рН.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Образец мяса гомогенизируют. Из различных твердых или жидких образцов пищевых продуктов готовят гомогенизированием однородную смесь.

Электроды рН-метра осторожно помещают в испытуемую смесь, имеющую температуру, при которой проводилась калибровка. Если рН-метр не снабжен регулятором температуры, то температура испытуемого образца должна быть равна 20 °С.

Проводят измерение значений рН в зависимости от конструкции рН-метра, дожидаясь, пока измеряемая величина не стабилизируется на постоянном значении. После каждого измерения зажиренные электроды протирают ватой, смоченной эфиром, затем спиртом, затем отмывают и промокают фильтровальной бумагой.

За результат измерения принимают среднее арифметическое значение из трех определений. Результат записывают с точностью до 0,1 единицы рН.

Разница между предельными значениями трех результатов измерений не должна превышать 0,15 единиц рН.

3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА (ХПК)

ХПК — показатель химического потребления кислорода (окисляемости при наличии в водной системе органических примесей).

Сущность метода заключается в обработке пробы воды серной кислотой и бихроматом калия при заданной температуре в присутствии сульфата серебра — катализатора окисления, и сульфата ртути (II), используемого для снижения влияния хлоридов, и определении значений ХПК в заданном диапазоне концентраций путем измерения оптической плотности исследуемого раствора при заданном значении длины волны с использованием градуировочной зависимости оптической плотности раствора от значения ХПК. Значения ХПК в диапазоне от 10 до 160 мгО₂/дм³ включительно определяют путем измерения оптической плотности раствора при длине волны (440±20) нм. Значения ХПК в диапазоне от 80 до 800 мгО₂/дм³ включительно определяют путем измерения оптической плотности раствора при длине волны (600±20) нм. Значения ХПК в диапазоне от 80 до 160 мгО₂/дм³ включительно допускается определять как при длине волны (440±20) нм, так и при длине волны (600±20) нм.

АППАРАТУРА И РЕАКТИВЫ

Фотометр, спектрофотометр или фотометрический анализатор в диапазоне длин волн от 400 до 700 нм. Реакционные сосуды из термостойкого стекла (пробирки с завинчивающимися крышками вместимостью от 10 до 15 см³). Нагревательный блок на (150±5) °С. Перемешивающее устройство, например магнитная мешалка, эксикатор или ультразвуковая ванна. Весы лабораторные с ценой деления 0,1 мг и наибольшим пределом взвешивания 220 г. Колбы мерные вместимостью 25, 50, 1000 см³. Цилиндры мерные. Стаканы химические термостойкие вместимостью 1000 см³. Пипетки градуированные или дозаторы пипеточные с допускаемой предельной погрешностью дозирования ±5%. Государственный (межгосударственный) стандартный образец (ГСО) бихроматной окисляемости с погрешностью аттестованного значения не более ±2%. Вода дистиллированная. Кислота серная, х.ч. Сульфат ртути (II), х.ч. или ч.д.а. Сульфат серебра, х.ч. или

ч.д.а. Калий двухромовокислый (дихромат калия), х.ч. или стандарт-титр (фиксанал). Бумага фильтровальная лабораторная.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Объем отбираемой пробы воды — не менее 100 мл. Отбор проб проводят в день выполнения анализа. Если пробы воды хранят до проведения анализа, то их подкисляют до pH меньше 2 разбавленной серной кислотой, добавляя 10 см³ кислоты в расчете на 1000 см³ пробы. Пробы воды хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 5 сут в защищенном от света месте. Срок хранения замороженных до –20 °С проб воды — не более 1 мес.

Для измерения значений ХПК в диапазоне от 80 до 800 мгО₂/дм³ высушенный при (105±5) °С в течение 2 ч дихромат калия в количестве 24,52 г, растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1000 см³ и доводят объем раствора в колбе дистиллированной водой до метки. Молярная концентрация эквивалента дихромата калия составляет 0,5 моль/дм³. Допускается готовить раствор дихромата калия из стандарт-титра по прилагаемой к нему инструкции. Срок хранения раствора — не более 6 мес.

Градуировку анализатора проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации с использованием градуировочных растворов в зависимости от диапазона измеряемых значений ХПК. В качестве нулевой пробы используют дистиллированную воду. Градуировочные растворы и нулевую пробу воды подготавливают к измерениям аналогично анализируемым пробам, измеряют значения оптической плотности растворов в реакционных сосудах при соответствующих длинах волн и устанавливают градуировочную зависимость оптической плотности растворов от значения ХПК, используя программное обеспечение к анализатору и/или программное обеспечение, предназначенное для обработки градуировочных зависимостей. Градуировочную характеристику признают стабильной, если абсолютное значение коэффициента корреляции, установленное программным обеспечением, не менее 0,98. Если коэффициент корреляции менее 0,98, градуировку анализатора повторяют.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят не реже одного раза в три месяца в соответствии с периодичностью, установленной в Руководстве по качеству лаборатории, с использованием не менее двух заново приготовленных градуировочных растворов с различными значениями ХПК. Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят также при смене партии реагента.

Одновременно анализируют не менее двух аликвотных порций пробы воды (параллельные пробы). Объем отбираемой аликвотной порции пробы воды — 2 см³. Допускается увеличение объема пробы воды до 4 см³.

Заполняют реакционные сосуды реагентом, который получают следующим образом. Перед началом работы в реакционный сосуд пипеткой или дозатором вносят 0,5 см³ раствора дихромата калия, осторожно добавляют 2,5 см³ раствора сульфата серебра, полученного полным растворением в стеклянной емкости 3,25 г сульфата серебра в 250 см³ концентрированной серной кислоты, затем 0,2 см³ раствора сульфата ртути (II), полученного растворением в стеклянной емкости 50 г сульфата ртути (II) в 200 см³ раствора серной кислоты со сроком хранения раствора в стеклянной емкости — не более 12 мес. Допускается добавлять 0,05 г сухой соли сульфата ртути (II) вместо раствора сульфата ртути (II). Смесь осторожно перемешивают вращательными движениями или с использованием любого перемешивающего устройства, затем закрывают сосуд крышкой. Реакционные сосуды, заполненные реагентом, хранят в светонепроницаемой таре в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С. Срок хранения заполненного реагентом реакционного сосуда — не более 12 мес. Содержимое реакционного сосуда перед применением перемешивают.

Перед использованием проводят визуальный осмотр реакционных сосудов и их содержимого. При обнаружении в сосуде трещин, повреждений любого типа или признаков зеленой окраски раствора, реакционный сосуд не используют.

Включают нагревательный блок, нагревают его до 150 °С и выдерживают при этой температуре не менее 10 мин.

Снимают крышку с реакционного сосуда и сразу же вносят в него дозатором или мерной пипеткой пробу воды, при необходимости предварительно тщательно перемешанной.

На реакционный сосуд плотно навинчивают крышку и перемешивают его содержимое, осторожно переворачивая несколько раз. Вытирают внешнюю поверхность реакционного сосуда фильтровальной бумагой. Помещают реакционный сосуд в нагревательный блок и выдерживают в течение (120±10) мин.

Осторожно вынимают реакционные сосуды из нагревательного блока и охлаждают при комнатной температуре до температуры не выше 60 °С. Перемешивают содержимое, переворачивая реакционные сосуды. Затем охлаждают реакционные сосуды до комнатной температуры. Реакционные сосуды, в которых произошло визуально заметное уменьшение объема содержимого, для измерений не используют. Анализ пробы воды в этом случае повторяют.

Метрологические характеристики метода

Диапазон измеряемых значений ХПК, мгО ₂ /дм ³	Предел повторяемости <i>r</i> (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами параллельных определений при <i>p</i> = 0,95), %	Предел воспроизводимости <i>R</i> (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами определений, полученными в условиях воспроизводимости при <i>p</i> = 0,95), %	Показатель точности (границы допускаемой относительной погрешности при вероятности <i>p</i> = 0,95), %
10–50	25	36	30
50–200	17	28	20
>200	14	19	15

Значения Δ вычисляют по формуле:

$$\Delta = 0,01 \cdot X_{\delta},$$

где X_{δ} — границы допускаемой относительной погрешности результатов измерения значения ХПК при доверительной вероятности $p = 0,95$ по табл. 1.1, %.

Допускается результат измерения представлять в виде $X \pm \Delta_{\text{лаб}}$, мгО₂/дм³, при доверительной вероятности $p = 0,95$, при условии $\Delta_{\text{лаб}} < \Delta$, где $\Delta_{\text{лаб}}$ — значение показателя точности измерений (доверительные границы абсолютной погрешности измерений), мгО₂/дм³, установленное при реализации настоящего метода в лаборатории и обеспечиваемое контролем стабильности результатов измерений.

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории предусматривает контроль стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости, контроль стабильности стандартного отклонения промежуточной прецизионности и контроль стабильности показателей правильности рутинного анализа с использованием ГСО бихроматной окисляемости.

Проверку совместимости результатов измерений, полученных в двух разных лабораториях, считают совместимыми при выполнении условия $X_{\text{max}}^I - X_{\text{min}}^{II} \leq 0,01 \cdot X_{\text{cp}} \cdot R$, где X_{max}^I — максимальное значение из двух результатов измерений ХПК, полученных в двух лабораториях, мгО₂/дм³; X_{min}^{II} — минимальное значение из двух результатов измерений ХПК, полученных в двух лабораториях, мгО₂/дм³; X_{cp} — среднеарифметическое значение результатов измерений, полученных в двух лабораториях, мгО₂/дм³; R — относительное значение предела воспроизводимости по табл. 3.1, %.

Если раствор после охлаждения прозрачен, то измеряют оптическую плотность пробы воды при рабочей длине волны 440 нм, используя реагент или при 600 нм, используя необходимый реагент. Если раствор мутный, то ему дают отстояться, затем измеряют его оптическую плотность как описано выше. Если после отстаивания раствор остается мутным, то анализ пробы воды повторяют, предварительно разбавив ее дистиллированной водой.

По значению оптической плотности раствора, измеренному, для каждой аликвотной порции пробы воды, используя градуировочную зависимость, определяют значение ХПК.

Если значение ХПК выходит за пределы диапазона построения градуировочной зависимости, то повторяют, либо разбавив пробу дистиллированной водой, либо используя реагент для работы с другим диапазоном значений ХПК.

Если проба воды подвергалась в процессе измерений разбавлению, то полученное значение ХПК умножают на коэффициент разбавления пробы воды K_p , который вычисляют по формуле

$$K_p = V_p / V_a,$$

где V_p — объем пробы воды после разбавления, см³; V_a — объем аликвотной порции пробы воды до разбавления, см³.

За результат измерения принимают среднеарифметическое значение не менее двух параллельных определений ХПК пробы воды X , мгО₂/дм³, при выполнении условия:

$$X_{\text{max}} - X_{\text{min}} \leq 0,01 \cdot X \cdot r,$$

где X_{max} — максимальное значение ХПК из двух параллельных определений, мгО₂/дм³; X_{min} — минимальное значение ХПК из двух параллельных определений, мгО₂/дм³; r — относительное значение предела повторяемости по табл. 3.1, %.

Метод обеспечивает получение результатов измерения с метрологическими характеристиками, не превышающими значений, приведенных в табл. 1.3, при доверительной вероятности $p = 0,95$.

Результаты измерений регистрируют в протоколе испытаний. Результат измерения представляют в виде

$$X \pm \Delta, \text{ мгО}_2/\text{дм}^3,$$

где X — определяемое значение ХПК, мгО₂/дм³; Δ — границы абсолютной погрешности измерений значения ХПК, мгО₂/дм³, при доверительной вероятности $p = 0,95$.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ К ГЛАВЕ 3

1. Какие важнейшие показатели безопасности и качества воды устанавливаются методами аналитической химии?
2. Почему необходимо при определении содержания химических веществ в водных системах соблюдать установленные методики анализа?
3. Отнести показатели качества воды к соответствующим группам: микробиологические показатели, физико-химические показатели, органолептические показатели?

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 3

ГОСТ Р 52361–2018. Контроль объекта аналитический. Термины и определения

Фомин, Г. С. Вода: Энциклопедический справочник. — М.: Изд-во «Протектор», 1995. — 650 с.

ГОСТ 2874–82. Вода питьевая.

ГОСТ Р 51232–98. Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества.

ГОСТ 32220–2013. Вода питьевая, расфасованная в емкости. Общие технические условия.

Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества: Санитарные правила и нормы СанПиН 2.1.4.2652–10. — М.: Госкомсанэпиднадзор РФ, 2010. — 112 с.

ГОСТ 6709–72. Вода дистиллированная. Технические условия.

Иванкин, А. Н., Неклюдов, А. Д., Карпо, Б. С. Определение свободных неорганических ионов в продуктах методом ионной хроматографии // Мясная индустрия. — 1997. — № 1. — С. 24–26.

Международный стандарт ИСО. Мясо и мясные продукты. Определение содержания влаги. Эталонный метод. — ISO 1442, 1997.

Международный стандарт ИСО. Мясо и мясные продукты. Контрольный метод определения концентрации водородных ионов (рН). — ISO 2917, 1974.

ГОСТ 31957–2012. Вода. Методы определения щелочности и массовой концентрации карбонатов и гидрокарбонатов.

ГОСТ 31859–2012. Вода. Метод определения химического потребления кислорода.

Глава 4

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ИОНОВ В РАСТВОРЕ

Качественное определение различных катионов и анионов в жидкой фазе представляет сегодня во многом исторический интерес, так как практически всегда решается вопрос не только наличия конкретных ионов, но и ставится задача их количественного определения. Химические реакции позволяют определять достаточно широкий спектр катионов и анионов. Большинство этих же реакций лежит в основе количественных методов. Сегодня для достоверной идентификации ионов металлов применяют эмисионно-спектральные методы анализа.

Наиболее распространенная классификация катионов по действию групповых реактив была предложена еще Н. А. Меншуткиным и применяется до настоящего времени.

I аналитическая группа катионов: NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Fr^+ , Mg^{2+} не имеет общего группового реактива, способного одновременно осадить все катионы этой группы при совместном присутствии, она делится на две подгруппы.

1-я подгруппа: NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Fr^+ осаждаются $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ в виде $\text{Kat}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ и $\text{NaHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ в виде $\text{KatHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$.

2-я подгруппа: Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} группового реактива не имеет.

II аналитическая группа катионов: Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ra^{2+} осаждаются общим групповым реактивом карбонатом аммония в виде нерастворимых карбонатов KatCO_3 . Катионы этой группы в отличие от катионов III–V групп не осаждаются сульфидом аммония или сероводородом в виде сульфидов.

III аналитическая группа катионов: Be^{2+} , Al^{3+} , Ti^{4+} , Cr^{3+} , Zr^{4+} , UO_2^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ga^{3+} , In^{3+} , Sc^{3+} , La^{3+} осаждаются общим групповым реактивом сульфидом аммония в виде нерастворимых сульфидов или гидроксидов. Группа подразделяется на две подгруппы.

1-я подгруппа: Be^{2+} , Al^{3+} , Ti^{4+} , Cr^{3+} , Zr^{4+} , UO_2^{2+} , Sc^{3+} , Y^{3+} , La^{3+} , Ac^{3+} осаждается общим групповым реактивом $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ в виде гидроксидов.

2-я подгруппа: Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ga^{3+} , In^{3+} осаждается групповым реактивом $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ в виде нерастворимых сульфидов.

Катионы III аналитической группы, в отличие от катионов IV и V групп не осаждаются сероводородом из солянокислого раствора в виде сульфидов.

IV аналитическая группа катионов: Hg^{2+} , Cu^{2+} , Bi^{3+} , Cd^{2+} , Pd^{2+} , Tl^{3+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , As^{3+} , As^{5+} , Sb^{3+} , Sb^{5+} , Ge^{4+} , Au^{3+} , Re^{4+} , Ir^{4+} , Pt^{4+} , V^{5+} , W^{6+} , Mo^{6+} осаждаются из кислого раствора общим групповым реактивом H_2S в виде сульфидов и сернистых соединений. Делится на две подгруппы.

1-я подгруппа: Hg^{2+} , Cu^{2+} , Bi^{3+} , Cd^{2+} , Pd^{2+} , Tl^{3+} образует сульфиды, нерастворимые в сернистом аммонии.

2-я подгруппа: Sn^{2+} , Sn^{4+} , As^{3+} , As^{5+} , Sb^{3+} , Sb^{5+} , Ge^{4+} , Au^{3+} , Re^{4+} , Ir^{4+} , Pt^{4+} , V^{5+} , W^{6+} , Mo^{6+} образует сернистые соединения, которые растворяются в растворе $(\text{NH}_4)_2\text{S}$.

Ионы IV аналитической группы, в отличие от V группы катионов, не осаждаются соляной кислотой в виде нерастворимых хлоридов.

V аналитическая группа катионов: Ag^+ , Pb^{2+} , $[\text{Hg}_2]^{2+}$, Cu^+ , Au^+ , Tl^+ , Pt^{2+} осаждаются осаждаются групповым реактивом — соляной кислотой в виде нерастворимых хлоридов, с нее начинают анализ смеси катионов всех групп. Действуя в определенном порядке соответствующими реактивами $[\text{HCl}$, H_2S , $(\text{NH}_4)_2\text{S}$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3]$ можно проводить систематический анализ сложных смесей катионов.

Общую аналитическую классификацию анионов по группам можно строить по разным веществам. Обычно разделение анионов осуществляют, используя классификацию, основанную на растворимости солей бария. Это позволяет разделить все основные анионы на две группы.

К первой аналитической группе анионов относят анионы, образующие в воде растворимые соли бария: Cl^- , Br^- , I^- , CN^- , SCN^- , S^{2-} , CNO^- , Se^{2-} , Te^{2-} , $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, NO_2^- , NO_3^- , CH_3COO^- , BrO_3^- , ClO^- , ClO_2^- , ClO_3^- , ClO_4^- , HCOO^- , MnO_4^{2-} , MnO_4^- . Анионы первой группы не осаждаются ионами бария.

Ко второй аналитической группе относятся анионы, образующие малорастворимые в воде соли бария: F^- , VO_3^- , BO_2^- , CO_3^{2-} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, SiO_3^{2-} , CrO_4^{2-} , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, MoO_4^{2-} , WO_4^{2-} , GeO_3^{2-} , PO_3^- , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, PO_4^{3-} , AsO_3^{3-} , AsO_4^{3-} , IO_3^- , IO_4^- , $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$, $[\text{SiF}_6]^{2-}$, SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , TeO_3^{2-} , TeO_4^{2-} .

Представляет интерес определение отдельных ионов.

4.1. КАТИОНЫ 1-Й АНАЛИТИЧЕСКОЙ ПОДГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ NH_4^+ -ИОНОВ

Щелочи разлагают соли аммония с выделением аммиака по реакции: $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- = \text{NH}_3\uparrow + \text{H}_2\text{O}$ при $\text{pH} > 9$.

Выделяющийся аммиак можно обнаружить по запаху, по образованию дыма — хлорида аммония при поднесении стеклянной палочки, смоченной концентрированной соляной кислотой, и по почернению фильтровальной бумаги, смоченной раствором нитрата ртути (I). Чувствительность обнаружения в присутствии Hg^+ составляет около 0,01 мкг.

Мешают определению амидо-ртутные соединения и цианиды.

К 1 капле разбавленного раствора соли аммония прибавляют 2 капли реактива Несслера. (Реактив Несслера готовят, прибавляя к 15 мл дистиллированной воды 15 г HgJ_2 и 10 г KJ , затем 80 мл 50%-ного раствора NaOH . Доводят водой без CO_2 до 500 мл и через 24 часа фильтруют через стеклянную вату или прокаленный асбест).

В присутствии NH_4^+ или NH_3 образуется желто-бурый осадок по реакции: $\text{NH}_4^+ + [\text{HI}_4]^{2-} + 2\text{OH}^- = (\text{IHg})_2\text{NH}_2\downarrow$ (желто-, красно-бурый, или лимонный) + $5\text{J}^- + 2\text{H}_2\text{O}$.

4.2. КАТИОНЫ 1-Й АНАЛИТИЧЕСКОЙ ПОДГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ K^+ -ИОНОВ

2 капли раствора соли калия смешать с 2 каплями раствора гексанитрокобальтата (III) натрия и потереть стеклянной палочкой о стенки сосуда. Выпадает желтый кристаллический осадок по реакции: $2\text{K}^+ + \text{Na}^+ + [\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3-} = \text{K}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6] \downarrow$ при $\text{pH} = 3.0$.

Мешают определению ионы NH_4^+ , перекиси, сероводород, сильнокислая среда, среда с $\text{pH} > 7$, сильное разбавление. Реактивы должны быть свежеприготовленные.

Прибавление 0,05% раствора AgNO_3 повышает чувствительность реакции за счет выпадения менее растворимой, чем $\text{K}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ соли $\text{K}_2\text{Ag}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$.

Вместо $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ можно использовать реактив $\text{NaPb}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$, который образует с ионами K^+ желтый кристаллический осадок $\text{KPb}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$.

Экспрессной качественной реакцией на присутствие ионов калия является внесение раствора в пламя горелки. Наличие ионов K^+ окрашивает пламя в характерный фиолетовый цвет.

4.3. КАТИОНЫ 2-Й АНАЛИТИЧЕСКОЙ ПОДГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Na⁺-ИОНОВ

К 2 каплям раствора соли натрия прибавить 2 капли раствора K[Sb(OH)₆] и потереть стеклянной палочкой о стенки сосуда. При pH = 7.0 на холоду выпадает белый кристаллический осадок по реакции: Na⁺ + [Sb(OH)₆]⁻ = Na[Sb(OH)₆]↓.

Определению мешают ионы NH₄⁺, Li⁺, Mg²⁺. Вредное влияние интерферирующих ионов устраняют кипячением пробы в щелочной среде с последующей установкой pH = 7.0 по соляной кислоте и упариванием пробы для концентрирования. Открываемый минимум 0,3 мкг.

Качественной реакцией на присутствие ионов натрия является внесение раствора в пламя горелки. Наличие летучих ионов Na⁺ окрашивает пламя в характерный желтый цвет.

4.4. КАТИОНЫ 2-Й АНАЛИТИЧЕСКОЙ ПОДГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Mg²⁺-ИОНОВ

К 2 каплям раствора соли магния прибавить по 2 капли раствора NH₄Cl, NH₄OH и 8-оксихинолина. При pH = 8.0–13.0 и нагревании выпадает зеленовато-желтый кристаллический осадок по реакции: Mg²⁺ + 2C₉H₆NOH = Mg(C₉H₆NO)₂↓ + 2H⁺.

Ионы NH₄⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ не образуют осадков с 8-оксихинолином, поэтому данную реакцию можно использовать для отделения ионов магния от остальных катионов I аналитической группы, в том числе от Li⁺.

Определению мешают многие катионы других групп. Катионы, кроме ионов 1-й и 2-й аналитической группы, должны отсутствовать.

4.5. КАТИОНЫ II АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Ca²⁺-ИОНОВ

К 2 каплям раствора соли кальция прибавить 2 капли раствора уксусной кислоты и 5 капель раствора оксалата аммония. При нагревании из концентрированного раствора сразу, а из разбавленного раствора постепенно образуется белый мелкокристаллический осадок оксалата кальция по реакции: Ca²⁺ + C₂O₄²⁻ = CaC₂O₄↓.

Мешают определению ионы стронция и бария. Катионы I аналитической группы за исключением Mg²⁺ выпадающего из концентрированных растворов в виде оксалата, не мешают обнаружению Ca²⁺.

4.6. КАТИОНЫ II АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Ba²⁺-ИОНОВ

К 2 каплям раствора соли бария прибавить 4 капли раствора хромата или дихромата калия. При нагревании и pH 3.0–5.0 образуется желтый мелкокристаллический осадок BaCrO₄ по реакции: 2Ba²⁺ + Cr₂O₇²⁻ + H₂O = 2BaCrO₄↓ + 2H⁺.

При добавлении дихромата калия в кислой среде добавляют осадитель — ацетат натрия. В нейтральной среде добавляют буферную смесь ацетата натрия с уксусной кислотой.

Мешают определению ионы серебра, свинца, ртути, висмута, кадмия, олова, кобальта, никеля и др., образующих с хромат-ионами осадки, которые следует удалить.

Бесцветное пламя окрашивается ионами Ba²⁺ в желто-зеленый цвет.

4.7. КАТИОНЫ III АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Al³⁺-ИОНОВ

1. К 2 каплям раствора соли алюминия прибавить 4 капли 6 н. раствора NH₄OH и нагреть до кипения. При нагревании и pH ≥ 4.1 образуется белый аморфный осадок Al(OH)₃ по реакции: Al³⁺ + 3NH₄OH = Al(OH)₃↓ + NH₄Cl. Осадок растворяется в избытке раствора гидроксида натрия и соляной кислоты, проявляя амфотерные свойства алюминия.

Полное осаждение гидроксида алюминия происходит при кипячении в избытке хлорида аммония.

Катионы III аналитической группы мешают определению ионов Al³⁺.

2. К 2 каплям раствора соли алюминия прибавить 3 капли 6 н. раствора NH₄OH. К полученному осадку Al(OH)₃ при кипячении прибавить 5 капель свежеприготовленного раствора ализарина. Образуется ализарин-алюминиевый лак оранжево-красного цвета, не растворимый при pH 4.0–5.0 в уксусной кислоте. В уксуснокислой среде осадок окрашивается в морковный цвет.

Ионы Mn²⁺, Fe²⁺, UO₂²⁺, Cr³⁺ также образуют окрашенные ализариновые лаки.

4.8. КАТИОНЫ III АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Cr³⁺-ИОНОВ

К 3 каплям раствора соли хрома (III) прибавить 5 капель H₂O₂, 3 капли 6 н. раствора КОН и нагреть до кипения. Происходит окисление Cr³⁺ в CrO₄²⁻ и изменение окраски из зелено-фиолетовой в желтую.

Добавление раствора сероводорода, HI, этанола или др. восстановителя вновь изменяет окраску из желтой в сине-зеленую или фиолетовую.

Появление CrO_4^{2-} подтверждают путем прибавления к нейтральному или щелочному желтому раствору хромата перекиси водорода и 1 мл амилового спирта с последующим закислением серной кислотой и взбалтыванием. Спиртовый слой окрашивается в интенсивно синий цвет за счет образования CrO_5 .

4.9. КАТИОНЫ III АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Mn^{2+} -ИОНОВ (ПО Н. А. ТАНАНАЕВУ)

На фильтровальной бумаге к 1 капле раствора соли марганца (II) прибавить 1 каплю аммиака серебра. Появляется черно-бурое пятно вследствие протекания реакции: $\text{Mn}^{2+} + 2[\text{Ag}(\text{NO}_3)_2]^+ + 2\text{OH}^- + 3\text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{MnO}_3\downarrow + 2\text{Ag}\downarrow + 2\text{NH}_4^+ + 2\text{NH}_4\text{OH}$. Реакция может осуществляться в присутствии всех катионов III аналитической группы. Мешают вещества, восстанавливающие $[\text{Ag}(\text{NO}_3)_2]^+$ до элементарного серебра.

4.10. КАТИОНЫ III АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Fe^{3+} -ИОНОВ

1. К 2 каплям раствора соли железа (III) прибавить 2 капли раствора HCl и 2 капли раствора гексацианоферрата (II) калия. При $\text{pH} = 2.0$ выпадает темно-синий осадок берлинской лазури: $4\text{Fe}^{3+} + 3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} = \text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3\downarrow$. Реакция чувствительна, открываемый минимум составляет 0,05 мкг.

Другие катионы, в т.ч. Fe^{2+} не мешают обнаружению Fe^{3+} . В присутствии оксалатов наблюдается синее окрашивание без выпадения осадка,

Избыток $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ мешает определению из-за образования коллоидов.

2. К 1 капле раствора соли железа (III) прибавить 5 капель дистиллированной воды и 5 капель раствора NH_4SCN . При $\text{pH} 2.0$ образуется кроваво-красное окрашивание. Реакции мешают анионы фосфорной, мышьяковой, фтористоводородной и др. кислот, образующих с ионами Fe^{3+} устойчивые комплексы. Нитриты, иодиды также мешают проведению реакции.

4.11. КАТИОНЫ III АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Fe^{2+} -ИОНОВ

1. К 2 каплям раствора соли железа (II) прибавить 1 каплю раствора винной кислоты, 3 капли раствора гексацианоферрата (III) калия. При $\text{pH} = 2.0$ выпадает темно-синий осадок турнбулевой сини по реакции: $3\text{Fe}^{2+} + 2[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} = \text{Fe}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2\downarrow$. Другие катионы, в т.ч. Fe^{3+} не мешают обнаружению Fe^{2+} . Окислители и восстановители мешают проведению реакции.

2. К 2 каплям раствора соли железа (II) прибавить 1 каплю раствора винной кислоты и 3 капли раствора NH_4OH . Прибавить 3 капли спиртового раствора диметилглиоксима. При $\text{pH} > 7.0$ образуется розово-красное окрашивание. Ионы Ni^{2+} с диметилглиоксимом образуют осадок розово-красного цвета.

4.12. КАТИОНЫ III АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Co^{2+} -ИОНОВ

К 3 каплям раствора соли кобальта (II) прибавить несколько кристаллов твердого NH_4SCN , перемешать. Появляется интенсивное синее окрашивание. Для увеличения чувствительности реакции к полученному раствору можно прибавить 1 мл амилового спирта, который при встряхивании окрашивается в синий цвет.

4.13. КАТИОНЫ 1-Й ПОДГРУППЫ IV АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Cu^{2+} -ИОНОВ

1. К 1 капле раствора соли меди (II), например CuSO_4 , прибавить 2 капли разбавленного раствора аммиака, выпадает сине-зеленый осадок основной соли меди: $2\text{CuSO}_4 + 2\text{NH}_4\text{OH} = \text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{SO}_4\downarrow + 2\text{NH}_4^+ + \text{SO}_4^{2-}$. При действии избытка аммиака образуется интенсивное васильково-синее окрашивание: $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{SO}_4 + 8\text{NH}_3 = 2[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{OH}^-$.

Реакция протекает при $\text{pH} \geq 9.0$. Ионы Ni^{2+} , Co^{2+} , SnCl_2 , формальдегид, соли аммония мешают проведению реакции.

2. К 2 каплям раствора соли меди (II) прибавить 2 капли раствора $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. При $\text{pH} < 7.0$ образуется красный осадок: $2\text{Cu}^{2+} + [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} = \text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]\downarrow$.

Ионы Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , окислители, восстановители, комплексообразователи мешают проведению реакции.

3. К 2 каплям раствора соли меди (II) прибавить 2 капли раствора KSCN. При pH < 7.0 образуется черный осадок $\text{Cu}(\text{SCN})_2$, который затем постепенно переходит в белый осадок CuSCN : $\text{Cu}^{2+} + 2\text{SCN}^- = \text{Cu}(\text{SCN})_2 \downarrow, 2\text{Cu}(\text{SCN})_2 + \text{H}_2\text{O} = 2\text{CuSCN} \downarrow + \text{HSCN} + \text{HOSCN}$. Последняя реакция значительно ускоряется в присутствии восстановителей, например, протекает мгновенно в присутствии сернистой кислоты: $\text{H}_2\text{SO}_3 + 2\text{Cu}(\text{SCN})_2 + \text{H}_2\text{O} = 2\text{CuSCN} \downarrow + 2\text{HSCN} + \text{H}_2\text{SO}_4$.

Ионы Ag^+ мешают, Cd^{2+} не мешают проведению реакции.

4. Ионы меди окрашивают пламя горелки в характерный зелено-вато-желтый цвет.

4.14. КАТИОНЫ 2-Й ПОДГРУППЫ IV АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Sn^{2+} -ИОНОВ

1. К 2 каплям насыщенного раствора соли олова (II) в соляной кислоте прибавить 5 капель раствора AsCl_3 . Выпадает черный осадок элементарного мышьяка. Аналогично растворы солей Sn^{2+} восстанавливают соединения платины, золота, серебра, ртути, меди, свинца, висмута и др. с образованием коллоидов элементарных металлов.

2. В кислых растворах добавление к солям олова (II) какотелина $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5(\text{NO}_2)_2$ вызывает фиолетовое окрашивание.

4.15. КАТИОНЫ 2-Й ПОДГРУППЫ IV АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Sn^{4+} .

В кислых растворах добавление к солям олова (IV) купферрона $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}(\text{NO})\text{ONH}_4$ вызывает образование малорастворимого осадка. Таким образом, удается количественно отделить Sn^{4+} от других ионов.

4.16. КАТИОНЫ V АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Ag^+ -ИОНОВ

1. К 1 капле раствора соли серебра, прибавить 1 каплю раствора HCl или хлорида. Выпадает белый творожистый осадок хлорида серебра: $\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- = \text{AgCl} \downarrow$. Осадок на свету частично темнеет из-за частичного восстановления до коллоидного элементарного серебра. Реакция хорошо протекает при pH < 7 в отсутствие комплексообразователей типа цианидов, тиосульфатов, роданидов, нитратов, переводящих осадок хлорида серебра в растворимую форму. Катионы: Cu^+ , Au^+ , Tl^+ ,

Pb^{2+} , $[\text{Hg}_2]^{2+}$ также мешают определению, так как образуют с Cl^- малорастворимые осадки.

2. К 1 капле раствора соли серебра, прибавить 1 каплю раствора K_2CrO_4 . При pH = 7.0 выпадает красно-бурый осадок: $2\text{Ag}^+ + \text{CrO}_4^{2-} = \text{Ag}_2\text{CrO}_4 \downarrow$. Катионы: Ba^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , $[\text{Hg}_2]^{2+}$ и др. катионы, образующие осадки с CrO_4^{2-} , а также восстановители, мешают определению.

3. В чистую пробирку, содержащую раствор ионов серебра добавить столько же раствора аммиака, затем несколько капель раствора формальдегида. После погружения пробирки в теплую воду на стенках образуется серебряное зеркало по реакции: $2[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+ + \text{HCHO} + 2\text{H}_2\text{O} = 2\text{Ag} \downarrow + 3\text{NH}_4^+ + \text{HCOO}^- + \text{NH}_4\text{OH}$.

4.17. КАТИОНЫ V АНАЛИТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ. ОБНАРУЖЕНИЕ Pb^{2+} -ИОНОВ

1. К 1 капле раствора соли серебра, прибавить 1 каплю раствора K_2CrO_4 . При pH < 7.0 в присутствии уксусной кислоты выпадает желтый осадок: $2\text{Pb}^{2+} + \text{CrO}_4^{2-} = \text{PbCrO}_4 \downarrow$. Катионы: Ba^{2+} , Hg^{2+} , $[\text{Hg}_2]^{2+}$ и др. катионы, образующие осадки с CrO_4^{2-} , а также восстановители, мешают определению.

2. Соли свинца окрашивают пламя в небесно-голубой цвет.

4.18. ОБНАРУЖЕНИЕ Cl^- -ИОНОВ

1. К 5 каплям раствора с хлоридными ионами прибавить 5 капель концентрированного раствора KMnO_4 и 5 капель конц. раствора H_2SO_4 и нагреть смесь (под тягой!). Наблюдается частичное или полное обесцвечивание раствора перманганата и выделение газообразного хлора, который обнаруживается с помощью иодокрахмальной бумаги (синее окрашивание), анилина (красно-фиолетовое окрашивание), смеси фенола с анилином (синее окрашивание), смеси флуоресцеина с KBr (розовое окрашивание). Хлор образует характерный запах. Реакция протекает при pH < 1.0 в отсутствие сильных восстановителей.

2. К 2 каплям раствора с ионами Cl^- прибавить 2 капли азотной кислоты и раствора AgNO_3 . Выпадает осадок AgCl , который растворяется в растворе аммиака, карбоната аммония и тиосульфата натрия, образуя растворимые комплексы.

Реакция достаточно чувствительна. В питьевой воде при добавлении раствора нитрата серебра образуется опалесцирующее помутнение коллоида AgCl .

Реакции мешают примеси ионов: CN^- , и SCN^- .

4.19. ОБНАРУЖЕНИЕ Вг⁻-ИОНОВ

К 5 каплям раствора КВг добавить 2 капли разбавленного раствора H₂SO₄, 0,5 мл бензола и 3 капли хлорной воды. В присутствии ионов Вг⁻, после встряхивания смеси, в слое бензола образуется желто-бурое окрашивание.

Реакция применима для обнаружения ионов Вг⁻ в присутствии Cl⁻ и I⁻.

4.20. ОБНАРУЖЕНИЕ I⁻-ИОНОВ

К 5 каплям раствора KI добавить 2 капли разбавленного раствора H₂SO₄, 10 капель бензола и по каплям 2 капли хлорной воды. В присутствии ионов I⁻, после встряхивания смеси, в слое бензола образуется красно-фиолетовое окрашивание.

Реакция протекает при pH ≤ 7.0. Вместо брома можно использовать раствор крахмала, окрашивающийся в синий цвет.

4.21. ОБНАРУЖЕНИЕ NO₃⁻-ИОНОВ

К 3 каплям дифениламина (C₆H₅)₂NH добавить 5 капель концентрированной H₂SO₄ и 2 капли анализируемого раствора. В присутствии ионов NO₃⁻, появляется темно-синее окрашивание. Нитриты дают аналогичную реакцию.

Обнаружению мешают ионы: NO₂⁻, MnO₄⁻, Cr₂O₇²⁻, [Fe(CN)₆]³⁻, ClO₃⁻, BrO₃⁻.

4.22. ОБНАРУЖЕНИЕ NO₂⁻-ИОНОВ

К 5 каплям испытуемого раствора, содержащего ионы NO₂⁻, добавить 5 капель раствора Co(NO₃)₂, 3 капли разбавленной уксусной кислоты и 3 капли раствора KCl. При этом образуется желтый кристаллический осадок гексанитрокобальтата (III) калия K₃[Co(NO₂)₆].

Ионы NO₃⁻ не мешают обнаружению NO₂⁻.

4.23. ОБНАРУЖЕНИЕ S²⁻-ИОНОВ

К 1 капле испытуемого раствора, содержащего сульфидные анионы, добавить одну каплю раствора NaOH и 1 каплю раствора нитропруссиды натрия.

Образуется комплексное соединение Na₄[Fe(CN)₅NOS], окрашенное в красно-фиолетовый цвет. При подкислении окраска обесцвечивается.

4.24. ОБНАРУЖЕНИЕ SO₄²⁻-ИОНОВ

К 2 каплям испытуемого раствора, содержащего сульфатные анионы, добавить 3 капли 6M раствора HCl и 2 капли раствора BaCl₂.

Мгновенно, при pH < 7.0 образуется белый кристаллический осадок сульфата бария, нерастворимый в соляной кислоте.

Описанные методы капельного анализа качественного обнаружения и идентификации отдельных катионов и анионов хорошо работают в случае распознавания чистых веществ. При анализе смесей ионов всегда присутствуют ионы, в той или иной степени, интерферирующие результат. Поэтому для достоверного обнаружения ионов сегодня применяют инструментальные методы физико-химического анализа.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ К ГЛАВЕ 4

1. Чем отличается качественный и количественный анализ в аналитической химии?
2. Сколько вещества надо иметь при выполнении качественного анализа ионов?
3. Какова точность качественного анализа?
4. Почему используют групповые реактивы на катионы?

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 4

Крешков, А. П. Основы аналитической химии. Т. I. Качественный и количественный анализ. — М.: Химия, 1970. — 472 с.

Основы аналитической химии в двух книгах /Под. ред. Ю. А. Золотова. — М.: Высшая школа, 1996. — Кн. I. — 384 с.

Harvey, D. Modern Analytical Chemistry. — Boston: McGraw Hill, 2000. — 816 p.

Глава 5

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ИОНОВ В РАСТВОРЕ. АНАЛИЗ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Важной задачей аналитической химии является установление содержания отдельных элементов в различных материалах, особенно природного происхождения. В силу естественного распространения химических элементов в земной коре в объектах обнаруживается большинство из известных сегодня химических элементов. Уровень их содержания определяется происхождением и технологическими особенностями переработки.

Таблица 5.1

Содержание токсичных элементов и их безопасный уровень в объектах различного происхождения

Наименование химического элемента	Объекты							
	волос человека, мг/кг	кость животная, мг/кг	молоко коровье сухое		мясо свинина-говядина		вода речная	
			содержание, мг/кг	ПДК, мг/кг	содержание, мг/кг	ПДК, мг/кг	содержание, мг/л	ПДК в питьевой воде, мг/л
Al	13	1	0,005	—	0,004–1	—	0,03	0,5
As	0,2–0,6	0,01	<0,01	0,05	0,05	0,1	0,0007	0,05
Ba	5–17	0,4	—	—	0,05	—	0,015	0,1
Be	0,006	—	—	—	—	—	0,0008	0,005
Ca	0,1–0,3%	27%	13 000	—	80–100	—	6–45	140
Cd	0,1	0,003	0,00001	0,03	0,01	0,05	0,00001	0,001
Co	0,1	—	0,006	—	0,001–0,2	—	0,03	—
Cu	0,1	0,8	—	1,0	2–30	5,0	0,5–1,3	1,0
Fe	70–150	100	2,3	—	70–180	—	0,1	0,3
Hg	0,2–2	—	—	0,005	—	0,03	—	0,0005
K	20	420	80–120	—	100–350	—	0,0007	—
Mg	150–300	0,5%	1 000	—	600–1100	—	1,5	84
Mn	3–6	1	1 200	—	—	—	0,004	0,1
Mo	0,1–0,7	—	0,3	—	0,08	—	0,0004	0,25

Наименование химического элемента	Объекты							
	волос человека, мг/кг	кость животная, мг/кг	молоко коровье сухое		мясо свинина-говядина		вода речная	
			содержание, мг/кг	ПДК, мг/кг	содержание, мг/кг	ПДК, мг/кг	содержание, мг/л	ПДК в питьевой воде, мг/л
Na	150–300	0,5%	4 000	—	30–75	—	2	—
Ni	0,8–3	—	0,06	—	0,05	—	0,0008	0,1
Pb	7	2	0,00002	0,05	0,2–0,3	0,5	0,00001	0,03
Sb	0,2	—	0,00001	—	0,01	—	0,00012	0,005
Zn	200	150	0,5	5,0	80–150	70	0,001	5

«—» — нет данных или ПДК не установлена.

Существует группа наиболее опасных химических элементов, прежде всего некоторых тяжелых и переходных металлов, которые проявляют высокую токсичность. К этой группе обычно относят 13 химических элементов: Hg, Pb, Cd, As, Sb, Sn, Zn, Al, Be, Cu, Ba, Cr, Tl. Не все из указанных элементов являются ядовитыми. Например, цинк является биоэлементом, обуславливая работу многих ферментных систем организма. Токсичность элемента определяется его природой, концентрацией и способностью к комплексообразованию. Некоторые токсичные и наиболее распространенные элементы в объектах разного происхождения приведены в табл. 5.1.

5.1. АТОМНО-АБСОРБЦИОННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Ионы металлов содержатся в пищевых объектах в свободном и связанном в прочные химические комплексы состоянии. Поэтому для количественного определения содержания токсичных элементов исследуемые объекты необходимо подвергнуть полной минерализации для высвобождения связанных металлов.

Для минерализации применяют высокотемпературную окислительную обработку, особенно эффективную в присутствии минеральных кислот, с последующим распылением минерализованного раствора в воздушно-ацетиленовом пламени и измерении резонансного поглощения атомов определяемого элемента при помощи атомно-абсорбционного спектрофотометра.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с погрешностью взвешивания $\pm 0,0002$ г. Электродуховка лабораторная, обеспечивающая поддержание температурного режима от 100 до 500 °С. Щипцы тигельные. Электроплитка или газовая горелка. Чашки или тигли фарфоровые или кварцевые с крышками. Пипетки автоматические на 0,1–50 мл. Цилиндры мерные вместимостью 5–500 мл. Колбы мерные вместимостью 25–500 мл. Воронки лабораторные. Фильтры обеззоленные с синей полосой. Штатив химический. Колбы Кьельдаля вместимостью 25–100 мл с грушевидными пробками. Стаканы химические вместимостью 50–150 мл. Колбы конические с пришлифованными пробками вместимостью 50–1000 мл. Шарикоподобные для равномерности кипения жидкостей.

Атомно-абсорбционный спектрофотометр, укомплектованный ацетиленовой горелкой, источником резонансного излучения железа, цинка, меди, хрома, никеля, свинца, кадмия и компрессором или сжатым воздухом в баллонах. Ацетилен растворенный и газообразный в баллонах.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Вода бидистиллированная. Кислота азотная осч, перегнанная, раствор в бидистиллированной воде (1:1 об.), 1% раствор. Кислота серная хч, перегнанная, раствор в бидистиллированной воде (1:9 об.). Кислота соляная хч, раствор в бидистиллированной воде (1:1 об.). Спирт этиловый ректификованный хч. Водорода перекись (пергидроль) хч. Лимонная кислота хч, 20% раствор в бидистилляте. Фенолфталеин чда, 1% водно-спиртовый раствор. Аммиак водный хч, 5% раствор. Натрия N, N'-диэтилдитиокарбамат чда, 0,5% раствор в бидистилляте, свежеприготовленный. Диэтиловый эфир хч. Стандартные растворы сравнения, содержащие (мкг/мл): железа 0,1–10, цинка 0,1–10, меди 0,05–5, хрома 0,1–5, никеля 0,1–5, свинца 0,1–2, кадмия 0,02–1. Срок хранения стандартных растворов 1 год.

Используют реактивы, в которых проведен контроль на содержание в них определяемых элементов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

На результаты определения элементов может оказывать существенное влияние загрязнение анализируемых проб металлами от используемой лабораторной посуды, воды и химических реактивов что необходимо учитывать при подготовке к анализу.

Лабораторную посуду моют раствором горячей азотной кислоты, раствор в бидистиллированной воде (1:1 об.), ополаскивают дистиллированной водой, моют раствором горячей соляной кислоты, раствор в бидистиллированной воде (1:1 об.), промывают бидистиллированной водой и высушивают.

Навеску продукта в количестве 20 г берут на обеззоленную бумагу, заворачивают и помещают в колбу Кьельдаля. Жидкие продукты в количестве 100 мл (молоко, минеральная вода) упаривают в колбе на электроплитке до объема 10 мл.

Параллельно проводят холостой опыт, добавляя в качестве пробы 10–20 мл бидистиллированной воды.

МИНЕРАЛИЗАЦИЯ ПРОБ МОКРЫМ СПОСОБОМ (КРОМЕ ЖИРОВ)

В колбы с навесками вносят азотную кислоту из расчета 10 мл на каждые 5 г продукта, выдерживают 15 мин, вносят 3 стеклянных шарика, закрывают грушевидными пробками и проводят постепенно усиливающееся нагревание смеси, обеспечивая ее равномерное кипение и упаривание до объема 5 мл. В колбу вносят 10 мл азотной кислоты, упаривают до 5 мл. Процесс повторяют 2–4 раза до прекращения выделения бурых паров.

В охлажденную колбу вносят, строго сохраняя последовательность, 10 мл азотной кислоты, 2 мл серной кислоты и 2 мл перекиси водорода на каждые 5 г продукта (молочные продукты минерализуют без серной кислоты), содержимое упаривают до объема 5 мл, не допуская образования коричневой окраски жидкости. При появлении коричневой окраски нагрев прекращают, пробу охлаждают до комнатной температуры.

В колбу добавляют 5 мл азотной кислоты и 2 мл H_2O_2 и нагревают до появления белых паров серного ангидрида. Если при этом раствор не обесцветится, то процедуру повторяют. Минерализацию считают законченной, если раствор после охлаждения остается бесцветным.

Для удаления остатков кислот в охлажденную колбу добавляют 10 мл бидистиллированной воды, нагревают до появления белых паров и кипятят в течение 10 мин, охлаждают. Добавление воды, кипячение и охлаждение повторяют 2 раза. Если при этом образуется осадок, в колбу вносят 20 мл бидистиллированной воды, 2 мл серной кислоты, 5 мл соляной кислоты и кипятят до растворения осадка, дополняя испаряющуюся воду.

После растворения осадка раствор упаривают до образования влажных солей.

МИНЕРАЛИЗАЦИЯ ПРОБ, СОДЕРЖАЩИХ ЖИРЫ

Колбу с навеской образца нагревают на электроплитке 8 ч до образования вязкой массы, охлаждают, добавляют 25 мл азотной кислоты и вновь осторожно нагревают, избегая бурного вспенивания. После прекращения вспенивания в охлажденную колбу добавляют 25 мл азотной кислоты, 12 мл перекиси водорода и нагревают до получения бесцветной жидкости. Если жидкость темнеет, то к ней периодически добавляют по 5 мл азотной кислоты, продолжая нагревание до завершения минерализации. Минерализацию считают законченной, если раствор после охлаждения остается бесцветным.

Для удаления остатков кислот в охлажденную колбу добавляют 10 мл бидистиллированной воды, нагревают до появления белых паров, кипятят в течение 10 мин и охлаждают. Добавление воды, кипячение и охлаждение повторяют 2 раза. Если при этом образуется осадок, в колбу вносят 20 мл бидистиллированной воды, 2 мл серной кислоты, 5 мл соляной кислоты и кипятят до растворения осадка, дополняя испаряющуюся воду. После растворения осадка раствор упаривают до образования влажных солей.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

В емкость с озоленной пробой добавляют разбавленную (1:1) азотную кислоту в количестве 1–5 мл в зависимости от зольности продукта и нагревают на электроплитке для растворения золя.

Раствор выпаривают до влажных солей, растворяют в 20 мл 1% раствора азотной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки той же кислотой.

Если зола растворилась не полностью, раствор с осадком упаривают до влажных солей, растворяют в 20 мл 1%-ной азотной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки той же кислотой.

Если зола растворилась не полностью, раствор с осадком упаривают до влажных солей, перерастворяют в минимальном объеме разбавленной (1:1) соляной кислоты, упаривают до влажных солей и растворяют в 20 мл 1%-ной соляной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки той же кислотой.

Если зола не растворилась, раствор доводят до объема 40 мл 1%-ной соляной кислотой, осторожно кипятят на плитке в течение 0,5 ч, отфильтровывают осадок через промытый растворителем обеззоленный фильтр, переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объ-

ем раствора до метки той же кислотой и используют для определения содержания токсичных элементов.

РАЗБАВЛЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ РАСТВОРОВ ПРОБЫ

Содержание определяемых элементов в растворах не должно выходить за пределы концентраций (мкг/мл): для железа и цинка 0,1–10, для меди 0,05–5, для хрома и никеля 0,1–5, для свинца 0,1–2, для кадмия 0,02–1.

Разбавление растворов проб проводят той же кислотой (1%-ной соляной или азотной) в случае превышения результатов определения для указанного интервала.

Коэффициент разбавления $K > 1$, определяется $K = V_2 / V_1$, где V_1 — объем аликвоты, взятой для разбавления, мл; V_2 — объем разбавленного раствора, мл.

Концентрирование проводят для повышения точности анализа и в случае, когда результаты определения лежат ниже указанного оптимального интервала концентраций.

В стаканы вместимостью 150 мл помещают аликвоты 10–50 мл испытуемых растворов в зависимости от требуемой степени концентрирования, доводят их объемы до 50 мл 1%-ным раствором кислоты, применявшейся для растворения проб. Параллельно берут в такие же стаканы 50 мл стандартных растворов сравнения.

В стаканы приливают по 10 мл раствора 20%-го раствора лимонной кислоты, добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и титруют раствором аммиака до появления слабо розового окрашивания.

Растворы переносят в делительные воронки на 100 мл, приливают по 5 мл 0,5% раствора натрия N, N'-диэтилдитиокарбамата и по 5 мл диэтилового эфира, встряхивая 1 мин. Проводят трехкратную экстракцию. Нижние водные слои отбрасывают, органические слои собирают и объединяют. Коэффициент концентрирования $K < 1$, определяется $K = V_2 / V_1$, где V_1 — объем аликвоты, взятой для концентрирования, мл; V_2 — объем органической фазы, мл.

ПРОВЕДЕНИЕ АТОМНО-АБСОРБЦИОННЫХ ИЗМЕРЕНИЙ

Проводят подготовку атомно-абсорбционного спектрофотометра к работе в соответствии с технической документацией, прогрев прибора проводят в течение 30 мин, прогревают включенную горелку с одновременной промывкой дистиллированной водой в течение 10 мин. Проводят настройку источников резонансного излучения и монохроматора, используя для работы наиболее чувствительные линии погло-

щения элементов с длинами волн: железа — 248,3 нм, цинка — 213,9 нм, меди — 324,8 нм, хрома — 357,9 или 359,4 нм, никеля — 232,5 нм, свинца — 283,3 или 217,0 нм, кадмия — 228,8 нм.

Выбор резонансной линии при измерениях абсорбции элементов определяется в зависимости от технических характеристик ламп спектрофотометра и проводится по критерию большего отношения сигнал/шум и по меньшей величине дрейфа нуля и чувствительности.

Распыляют в пламени нулевой стандарт (холостая проба без определяемого элемента), затем в порядке возрастания концентрации измеряют абсорбцию стандартных растворов сравнения, в конце вновь определяют нулевое положение распылением в пламени нулевого стандарта. При прямом определении свинца, кадмия, никеля коррекция фонового поглощения обязательна для каждого измерения.

При наличии компьютерной системы обработки данных для получения результата используют рекомендованную программу, либо строят зависимость величины абсорбции от концентрации.

Таблица 5.2

Атомно-абсорбционное определение содержания металлов

Элемент	Длина волны, нм	Оптимальный диапазон рабочих концентраций, мкг/мл	Предел определения, мкг/мл
Na	330,2	10–100	1
Na	589,6	2–30	0,1
Na	589,0	0,5–5	0,005
K	404,5	50–1000	8
K	769,9	5–50	0,5
K	766,5	0,5–10	0,005
Mg	285,2	0,1–10	0,001
Ca	422,7	5–30	0,01
Fe	248,3	1–10	0,01
Zn	213,9	1–10	0,002
Cu	324,8	0,005–5	0,003
Mn	279,5	0,1–2	0,003
Pb	283,3	0,1–2	0,02
Pb	217,0	0,1–2	0,01
Cd	228,8	0,02–1	0,001
Co	240,7	0,05–2	0,01
Ni	232,1	0,1–5	0,01
Cr	357,9	0,1–5	0,005
Cr	359,4	0,05–5	0,005

Массовую долю элемента в пробе X (ppm или мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = (C_1 - C_2) \cdot V \cdot K / g,$$

где C_1 — концентрация элемента в испытуемом растворе, мкг/мл; C_2 — среднеарифметическая концентрация элемента для параллельных контрольных растворов, мкг/мл; V — исходный объем испытуемого раствора, мл; g — навеска пробы, г; K — коэффициент разбавления, мл.

Измерения проводят для серии, не менее 10 стандартных растворов с концентрацией элемента не выше 0,2 мкг/мл и рассчитывают стандартное отклонение S_0 по формуле:

$$S_0 = (\sum(C_i^1 - C_i^2)\sqrt{2}) / (2M),$$

где $(C_i^1 - C_i^2)$ — расхождения параллельных измерений концентраций элемента в i -растворе; M — количество растворов.

Величина $3S_0$ считается пределом обнаружения элемента в растворе при $p = 0,99$.

Вычисления проводят до второго десятичного знака. Окончательный результат округляют до первого десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, относительное стандартное отклонение воспроизводимости определения не должно превышать $\delta\%$ по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$. Значение δ составляет: для Pb и Cd при $C = 0,01$ ppm, $\delta = \pm 40\%$, при $C = 1,0$ ppm, $\delta = \pm 9\%$; для Cr при $C = 0,01$ ppm, $\delta = \pm 65\%$, при $C = 1,0$ ppm, $\delta = \pm 24\%$; для Ni при $C = 0,02$ ppm, $\delta = \pm 90\%$, при $C = 10,0$ ppm, $\delta = \pm 9\%$; для Cu при $C = 0,5$ ppm, $\delta = \pm 29\%$, при $C = 30,0$ ppm, $\delta = \pm 8\%$; для Zn при $C = 1,0$ ppm, $\delta = \pm 26\%$, при $C = 100,0$ ppm, $\delta = \pm 9\%$; для Fe при $C = 10,0$ ppm, $\delta = \pm 55\%$, при $C = 200,0$ ppm, $\delta = \pm 15\%$.

При наличии соответствующей укомплектованности прибора наиболее частые определения проводят для следующих элементов (табл. 5.2).

5.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} МЕТОДОМ ИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Метод основан на экстракции ионов водой, очистке экстракта или прямом определении концентрации катионов в растворе пробы с использованием кондуктометрического датчика.

ОБОРУДОВАНИЕ

Портативный ионный хроматограф IC-2001 фирмы Eppendorf-Biotronic (ФРГ) с кондуктометрическим детектором и колонкой (Cation separation kit с колонкой VT VIII-КА-P) для определения катионов (Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), присоединенный к компьютеру с автоматической программой обсчета хроматографических данных типа Winpeak фирмы Eppendorf-Biotronic (ФРГ).

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности и пределом допустимой погрешности 0,2 мг. Автоматические пипетки 1–2–5–10–25 см³. Микрошприц для жидкостной хроматографии на 100 мкл. Бумага фильтровальная лабораторная. Мембранный фильтр 0,45 мкм. Картридж С18. Микрогомогенизатор для измельчения твердых образцов. Гелий для хроматографии в баллоне.

РЕАКТИВЫ

Вода бидистиллированная или квалификации для ВЭЖХ. Готовые растворы производства Eppendorf-Biotronic (ФРГ): концентрат ЕК-VIII-КА-AL для определения Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ разбавленный 1:100; модификатор I (M-VIII-КА-01) голубой; модификатор II (M-VIII-КА-02), элюентный концентрат (ЕК-VIII-КА-ER) для определения Mg^{2+} , Ca^{2+} разбавленный 1:100; ГСО стандартных растворов катионов Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} или готовые стандартные растворы, содержащие 10 ppm (мг/л) ионов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Водные растворы буферов и элюентов подвергают фильтрации через мембранный фильтр 0,45 мкм и дегазируют барбатированием в течение 30 мин газообразным He из баллона.

Все растворы, вводимые в жидкостную линию хроматографа, включая элюент, подвергают мембранной фильтрации через фильтр 0,45 мкм.

Твердые образцы подвергают гомогенизации в воде (1:100) с последующей фильтрацией раствора через бумагу, картридж С18 для удаления избытка органических кислот и мембранный фильтр 0,45 мкм.

Ионный хроматограф включают и подготавливают к работе в соответствии с технической документацией на хроматограф, устанавливая диапазон измерений по чувствительности — 1, определение катионов, расход элюента 1,4 мл/мин (давление 22 бар) и записывают в течение 30 мин базовую линию, используя компьютерную программу обработки данных.

Колонки хроматографа промывают в течение 10 мин элюентом. По окончании работы, в случае длительного хранения, колонки промывают бидистиллированной водой и заполняют метанолом.

В инжектор хроматографа вводят Гамильтоновским микрошприцем 100 мкл Модификатора 1, через 5 мин закол Модификатором 1 повторяют для очистки колонки от бивалентных катионов.

В инжектор хроматографа вводят Гамильтоновским микрошприцем 100 мкл модификатора 2, через 5 мин закол повторяют или не повторяют в зависимости от времен удержания пиков определяемых катионов. Однократное введение модификатора 2 сужает разделение пиков.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

АНАЛИЗ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ

Микрошприцем в подготовленный в соответствии с инструкцией по эксплуатации хроматограф при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью элюент, разбавленный 1:100, ЕК-VIII-КА-AL для определения Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , в отверстие клапана закалывают 100 мкл стандартного раствора, содержащего Li^+ — 0,5 ppm, Na^+ — 2,5 ppm, NH_4^+ — 2,5 ppm, K^+ — 5 ppm (мг/л) ионов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию. Автоматически записывают стандартную хроматограмму, по которой определяют и вводят в компьютерную программу пересчетные коэффициенты.

Хроматограф с установленной скоростью потока промывают элюентом до выравнивания базовой линии (базовая линия на мониторе должна иметь вид горизонтальной прямой) в течение 10–15 мин и микрошприцем при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью элюент, в отверстие клапана закалывают 100 мкл анализируемого раствора пробы с неизвестным содержанием щелочных катионов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию.

Автоматически записывают хроматограмму, которая в соответствии с общепринятыми нормами оценки результатов хроматографических данных должна содержать четыре отдельно стоящих пика (соответствующих Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+), высота которых не должна превышать достоверно анализируемую высоту в мВ («обрезанные пики») и расстояние между которыми не должно быть меньше половины полуширины основания одного из пиков. При нарушении этих условий повторяют «закол» неизвестной пробы, разбавляя ее в 10 раз. В резуль-

тате анализа раствора с неизвестной концентрацией на хроматограмме должны идентифицироваться четкие пики с высотой не менее 10 мВ (<10 мВ сильно разбавленный раствор пробы) и не более 200 мВ (>200 мВ растворы, концентрированные по определяемым ионам).

При получении удовлетворительных результатов и в соответствии с введенной калибровкой автоматически получают результат содержания Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ ионов в анализируемой пробе в мг/л.

АНАЛИЗ ЩЕЛОЧНОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ

Микрошприцем в хроматограф, подготовленный в соответствии с инструкцией по эксплуатации при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью разбавленный 1:100 элюент (ЕК-VIII-КА-ЕР) для определения Mg^{2+} и Ca^{2+} , в отверстие клапана закалывают 100 мкл стандартного раствора, содержащего Mg^{2+} – 10 ppm, Ca^{2+} – 20 ppm (мг/л) ионов.

Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию. Автоматически записывают стандартную хроматограмму, по которой определяют и вводят в компьютерную программу пересчетные коэффициенты.

Хроматограф с установленной скоростью потока промывают элюентом до выравнивания базовой линии (базовая линия на мониторе должна иметь вид горизонтальной прямой) в течение 10–15 мин и микрошприцем при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью элюент, в отверстие клапана закалывают 100 мкл анализируемого раствора пробы с неизвестным содержанием щелочных катионов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию.

Автоматически записывают хроматограмму, которая в соответствии с общепринятыми нормами оценки результатов хроматографических данных должна содержать два отдельно стоящих пика (соответствующих Mg^{2+} , Ca^{2+}), высота которых не должна превышать достоверно анализируемую высоту в мВ («обрезанные пики») и расстояние между которыми не должно быть меньше половины полуширины основания одного из пиков.

При нарушении этих условий повторяют «закол» неизвестной пробы, разбавляя ее в 2–10 раз.

При получении удовлетворительных результатов и в соответствии с введенной калибровкой автоматически получают результат содержания ионов щелочно-земельных металлов в анализируемой пробе в мг/л.

РАСЧЕТ

Определение концентрации в анализируемом растворе осуществляется автоматически по соответствующим временам удержания пиков катионов и их площадям, протокол распечатывается.

Вычисления автоматически проводятся до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания катионов в любой пробе при допустимых методикой изменениях влияющих факторов $\pm 0,15X$.

Минимальная определяемая концентрация — 1 ppm (мг/л).

5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ АНИОНОВ (Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Метод основан на экстракции ионов водой, очистке экстракта или прямом определении концентрации анионов в растворе пробы с использованием кондуктометрического датчика.

ОБОРУДОВАНИЕ

Портативный ионный хроматограф IC-2001 фирмы Eppendorf-Biotronic (ФРГ) с кондуктометрическим детектором и колонкой (Anion separation kit с колонкой BT-X-AN-S) для определения анионов (Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}), присоединенный к компьютеру с автоматической программой обсчета хроматографических данных типа Winpeak фирмы Eppendorf-Biotronic (ФРГ). Гелий газообразный в баллоне.

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности и пределом допустимой погрешности 0,2 мг. Автоматические пипетки 1–2–5–10–25 см³. Микрошприц для жидкостной хроматографии на 100 мкл. Бумага фильтровальная лабораторная. Мембранный фильтр 0,45 мкм. Картридж C18. Сульфокатионит типа DC-50. Микрогомогенизатор для измельчения твердых образцов.

РЕАКТИВЫ

Вода бидистиллированная или квалификации для ВЭЖХ. Готовые растворы производства Eppendorf-Biotronic (ФРГ): элюентный концентрат ЕК–Х–АН разбавленный 1:10; ГСО стандартных растворов ионов (Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) или готовые стандартные растворы, содержащие 10 ppm (мг/л) анионов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Водные растворы подвергают фильтрации через мембранный фильтр 0,45 мкм. Для удаления избытка ионов жесткости (Ca^{2+} / Mg^{2+}) добавляют к 50 мл пробы 1–2 г ионита D-50. Количество добавленной смолы зависит от ожидаемого содержания ионов Ca^{2+} / Mg^{2+} . Тщательно встряхивают пробу со смолой в течение нескольких мин, добавляют 8–10 мл элюентного концентрата ЕК–Х–АН и перемешивают.

Все растворы, вводимые в жидкостную линию хроматографа, включая элюент, подвергают мембранной фильтрации через фильтр 0,45 мкм и дегазируют, пропуская He из баллона.

Твердые образцы подвергают гомогенизации в воде (1:100) с последующей фильтрацией раствора через бумагу, картридж С18 для удаления избытка органических кислот и мембранный фильтр 0,45 мкм.

Ионный хроматограф включают и подготавливают к работе в соответствии с технической документацией на хроматограф, устанавливая диапазон измерений по чувствительности — 1, определение анионов, объем вводимой пробы 100 мкл, расход элюента 1,4 мл/мин (давление 50 бар) и записывают в течение 30 мин базовую линию, используя компьютерную программу обработки данных.

Колонки хроматографа промывают в течение 10 мин разбавленным элюентом. По окончании работы, в случае длительного хранения, колонки промывают бидистиллированной водой и заполняют метанолом.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

АНАЛИЗ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ

Микрошприцем в подготовленный в соответствии с инструкцией по эксплуатации хроматограф при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью разбавленный 1:10 элюент ЕК–Х–АН для определения Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , в отверстие клапана закалывают 100 мкл стандартного раствора, содержащего указанные анионы в количестве 10 ppm (мг/л). Микрошприц из клапана

не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию. Автоматически записывают стандартную хроматограмму, по которой определяют и вводят в компьютерную программу пересчетные коэффициенты.

Хроматограф с установленной скоростью потока промывают элюентом до выравнивания базовой линии (базовая линия на мониторе должна иметь вид горизонтальной прямой) в течение 10–15 мин и микрошприцем при работающем автоматическом насосе, качающем элюент с заданной скоростью, в отверстие клапана закалывают 100 мкл анализируемого раствора пробы с неизвестным содержанием анионов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию.

Автоматически записывают хроматограмму, которая в соответствии с общепринятыми нормами оценки результатов хроматографических данных должна содержать отдельно стоящие пики, соответствующие содержанию Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , высота которых не должна превышать достоверно анализируемую высоту в мВ («обрезанные пики») и расстояние между которыми не должно быть меньше половины полуширины основания одного из пиков. При нарушении этих условий повторяют «закол» неизвестной пробы, разбавляя ее в 2–10 раз. В результате анализа раствора с неизвестной концентрацией на хроматограмме должны идентифицироваться четкие пики с высотой не менее 10 мВ (<10 мВ очень сильно разбавленный раствор пробы) и не более 200 мВ (>200 мВ очень концентрированные по определяемым ионам растворы).

При получении удовлетворительных результатов и в соответствии с введенной калибровкой автоматически получают результат содержания Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} ионов в анализируемой пробе в мг/л.

РАСЧЕТ

Определение концентрации в анализируемом растворе осуществляется автоматически по соответствующим временам удержания пиков ионов и их площадям, протокол распечатывается.

Вычисления автоматически проводятся до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 30% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания нитритов и нитратов в любой пробе при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов $\pm 0,15X$.

Минимальная определяемая концентрация — 1 ppm (мг/л).

5.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРИДНЫХ ИОНОВ ТИТРОВАНИЕМ АЗОТНОКИСЛЫМ СЕРЕБРОМ

СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод основан на осаждении хлор-иона в нейтральной или слабощелочной среде азотнокислым серебром в присутствии хромовокислого калия в качестве индикатора. После осаждения хлорида серебра в точке эквивалентности образуется хромовокислое серебро, при этом желтая окраска раствора переходит в оранжево-желтую. Точность метода 1–3 мг/дм.

АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Посуда мерная стеклянная лабораторная, вместимостью: пипетки на 100, 50 и 10 см³ без делений; пипетка на 1 см³ с делением через 0,01 см³; цилиндр мерный на 100 см³; бюретка на 25 см³ со стеклянным краном. Колбы конические с вместимостью 250 см³. Капельница. Пробирки колориметрические с отметкой на 5 см³. Воронки стеклянные. Фильтры беззольные «белая лента». Серебро азотнокислое (нитрат серебра). Хлорид натрия. Квасцы алюмокалиевые (сульфат алюминий-калия). Калия хромат. Аммиак водный, 25%-ный раствор. Вода дистиллированная. Все реактивы, используемые для анализа, должны быть квалификации чистые для анализа (ч.д.а.).

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТИТРОВАННОГО РАСТВОРА НИТРАТА СЕРЕБРА

2,40 г химически чистого AgNO₃ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора дистиллированной водой до 1 дм³. 1 см³ раствора эквивалентен 0,5 мг Cl⁻. Раствор хранят в склянке из темного стекла в течение 1 нед.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ 10%-НОГО РАСТВОРА НИТРАТА СЕРЕБРА

10 г AgNO₃ растворяют в 90 см³ дистиллированной воды и добавляют 1–2 капли азотной кислоты.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТИТРОВАННОГО РАСТВОРА ХЛОРИДА НАТРИЯ

0,8245 г химически чистого NaCl, высушенного при 105 °С, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора дистиллированной водой до 1 дм³. 1 см³ раствора содержит 0,5 мг Cl⁻.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГИДРОКСИДА АЛЮМИНИЯ

125 г алюмокалиевых квасцов AlK(SO₄)₂·12H₂O растворяют в 1 дм³ дистиллированной воды, нагревают до 60 °С и постепенно прибавляют 55 см³ концентрированного раствора аммиака при постоянном перемешивании. После отстаивания в течение 1 ч осадок переносят в большой стакан и промывают декантацией дистиллированной водой до исчезновения реакции на хлориды (отсутствие помутнения при прикапывании раствора нитрата серебра).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ 5%-НОГО РАСТВОРА ХРОМАТА КАЛИЯ

50 г K₂CrO₄ растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды и доводят объем раствора дистиллированной водой до 1 дм³.

УСТАНОВКА ПОПРАВочНОГО КОЭФФИЦИЕНТА К РАСТВОРУ НИТРАТА СЕРЕБРА

В коническую колбу вносят пипеткой 10 см³ раствора хлористого натрия и 90 см³ дистиллированной воды, добавляют 1 см³ раствора хромата калия и титруют раствором нитрата серебра до перехода лимонно-желтой окраски мутного раствора в оранжево-желтую, не исчезающую в течение 15–20 с. Полученный результат считают ориентировочным. К оттитрованной пробе прибавляют 1–2 капли раствора хлористого натрия до получения желтой окраски. Эта проба является контрольной при повторном, более точном определении. Для этого отбирают новую порцию раствора хлористого натрия и титруют азотнокислым серебром до получения незначительной разницы оттенков слабооранжевого в титруемом растворе и желтого в контрольной пробе.

Поправочный коэффициент (K) вычисляют по формуле:

$$K = 10 / v,$$

где v — количество нитрата серебра, израсходованное на титрование, см³.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

В колориметрическую пробирку наливают 5 см³ воды и добавляют три капли 10%-ного раствора нитрата серебра. Примерное содержание хлорид-иона определяют по осадку или мути в соответствии с требованиями табл. 5.3.

Таблица 5.3

Образование осадка

Характеристика осадка или мути	Содержание Cl ⁻ , мг/дм ³
1. Опалесценция или слабая муть	1–10
2. Сильная муть	10–50
3. Образуются хлопья, осаждаются не сразу	50–100
4. Белый объемный осадок	Более 100

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

В зависимости от результатов качественного определения отбирают 100 см³ испытуемой воды или меньший ее объем (10–50 см³) и доводят до 100 см³ дистиллированной водой. Без разбавления определяются хлориды в концентрации до 100 мг/дм³. рН титруемой пробы должен быть в пределах 6.0–10.0. Если вода мутная, ее фильтруют через беззольный фильтр, промытый горячей водой. Если вода имеет цветность выше 30°, пробу обесцвечивают добавлением гидроокиси алюминия. Для этого к 200 см³ пробы добавляют 6 см³ суспензии гидроокиси алюминия, а смесь встряхивают до обесцвечивания жидкости. Затем пробу фильтруют через беззольный фильтр. Первые порции фильтрата отбрасывают. Отмеренный объем воды вносят в две конические колбы и прибавляют по 1 см³ раствора хромовокислого калия. Одну пробу титруют раствором азотнокислого серебра до появления слабого оранжевого оттенка, вторую пробу используют в качестве контрольной пробы. При значительном содержании хлоридов образуется осадок AgCl, мешающий определению. В этом случае к оттитрованной первой пробе приливают 2–3 капли титрованного раствора NaCl до исчезновения оранжевого оттенка, затем титруют вторую пробу, пользуясь первой пробой как контрольной.

Определению мешают: ортофосфаты в концентрации, превышающей 25 мг/дм³; железо в концентрации более 10 мг/дм³. Бромиды и йодиды определяются в концентрациях, эквивалентных Cl⁻. При обычном содержании в водопроводной воде они не мешают определению.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание хлоридных ионов (X), мг/дм³, вычисляют по формуле

$$X = v \cdot K \cdot g \cdot 1000 / V,$$

где v — количество азотнокислого серебра, израсходованное на титрование, см³; K — поправочный коэффициент к титру раствора нитрата серебра; g — количество хлор-иона, соответствующее 1 см³ раствора азотнокислого серебра, мг; V — объем пробы, взятый для определения, см³.

Расхождения между результатами повторных определений при содержании от 20 до 200 мг/дм³–2 мг/дм³; при более высоком содержании — 2 отн. %.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ К ГЛАВЕ 5

1. Особенности ионной хроматографии. В чем заключаются ее преимущества?
2. Какова точность определения содержания металлов различными методами?
3. Почему в ряде аналитических процедур удаляют примеси других ионов?

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 5

Шпигун, О. А., Золотов, Ю. А. Ионная хроматография и ее применение в анализе вод. — М.: МГУ, 1990.

Кузнецова, Т. Г., Иванкин, А. Н., Куликовский, А. В. Наносенсорный анализ мясного сырья и растительных объектов: монография Saarbrücken, Germany: LAMBERT Academic Publishing, 2013. — 224 p.

ГОСТ 30178–96. Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов.

ГОСТ 4245–72. Вода питьевая. Методы определения содержания хлоридов

Глава 6

МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

В состав всех объектов природного происхождения входят макроэлементы, в первую очередь К, Na, Ca, Si, Mg, S, P, Cl, а также микроэлементы (Al, B, V, Fe, I, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Sn, Se, Ag, Sr, Ti, F, Cr, Zn и Zr), которые вместе с неорганическими анионами образуют комплексы минеральных солей. Общее представление о содержании минеральных веществ дает зола.

Человеку с питанием необходимо получать минеральные вещества в оптимальных количествах, поэтому должен осуществляться жесткий аналитический контроль за минеральными веществами. Уровень их содержания должен соответствовать нормативам (табл. 6.1).

Таблица 6.1

Суточная потребность человека в минеральных веществах в активном периоде развития (г/сут)

Возраст	Ca	P	Mg	Fe	Na	Zn	I	Co	Cu	Mn
	мг/сут						мкг/сут		мкг/кг массы	
До 1 года	1000	1500	40–70	7	250	1–2	45	0,3	60–100	20–200
До 6 лет	1000	1500	140	8	–	15	–	1	170–1500	2500
До 10 лет	1200	2000	250	10	–	15	–	1,5	40	–

6.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ ЗОЛЫ В ТВЕРДОМ ОБРАЗЦЕ

Содержание золы в большинстве пищевых продуктов колеблется на уровне нескольких процентов: говядина, свинина, баранина 0,9–1,0; жиры животные 0,02–0,07; сало свиное — 0,1; птица 0,9–1,3; яйцо 1,1–1,2; молоко коровье 0,7–0,9; рыба и морепродукты 1,1–1,7; злаки 1,7–4,6; бобовые 1,2–3,6; соя 4,5–5; овощи 0,5–1,0; фрукты 0,5–0,7 г/100 г массы.

Метод основан на высокотемпературном сжигании органической части образца и гравиметрическом определении количества негорячего остатка (золы).

Метод предназначен для определения массовой доли золы в твердых пищевых продуктах.

АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Печь муфельная с регулируемой температурой 100–1000 °С. Горелка газовая или плитка. Тигли фарфоровые. Щипцы тигельные. Эксикатор с осушающим силикагелем или прокаленным хлоридом кальция.

ПОДГОТОВКА ТИГЛЕЙ

Тигли новые или использованные обрабатывают кипящей разбавленной соляной кислотой, затем обильно промывают водопроводной водой и ополаскивают дистиллированной водой.

Непосредственно перед использованием тигли прокаливают в муфельной печи при 900 °С до достижения постоянной массы (примерно в течение 15 мин). Затем тигли охлаждают при комнатной температуре в эксикаторе с прокаленным хлоридом кальция в течение 1 ч и взвешивают с точностью $\pm 0,0001$ г.

ПОДГОТОВКА НАВЕСКИ

Из пробы, взвешенной с точностью $\pm 0,01$ г навески, г: а) 5–6 г для образцов, в которых содержание золы ожидается меньше 1% на сухое вещество; б) 2–3 г для образцов, в которых содержание золы ожидается более 1% на сухое вещество. Взвешенную навеску помещают в подготовленный и взвешенный тигель. Навеску распределяют без уплотнения для создания однородного слоя и быстро взвешивают с точностью $\pm 0,001$ г.

ОЗОЛЕНИЕ

Для обеспечения равномерного озоления навеску в тигле увлажняют непосредственно перед озолением 1–2 см³ этилового спирта. Помещают тигель на открытую дверцу муфельной печи у входа в печь и только после того как навеска обгорит тигель помещают щипцами внутрь муфельной печи при температуре 900 °С. При закрытой дверце

обеспечивают достаточную вентиляцию, но без сильного сквозняка, чтобы не было уноса золы из тигля. Озоление проводят пока вся навеска (в том числе углеродистые частицы) не сгорит. Озоление считают законченным, когда охлажденный остаток становится белым или почти белым, что обычно занимает около 2–6 ч.

РАСЧЕТ

Содержание массовой доли золы ($X, \%$) вычисляют по формуле:

$$X = G_a \cdot 100 / g,$$

где g — масса взятого на прокаливание образца, г; G_a — масса золы после прокаливания в г.

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СУХОГО ОСТАТКА ЖИДКОГО ОБРАЗЦА

Минеральные вещества являются частью общего содержания химических веществ в природных объектах. Некоторые жидкие продукты, полученные химико-ферментативной обработкой сырья, например гидролизаты, содержат в растворенном виде органические и неорганические вещества.

Сумму этих веществ, отделяемых от влаги без разложения, называют сухим остатком (с.о.), который равен массе золы плюс масса органических веществ.

Определение содержания сухих веществ проводят рефрактометрическим методом или высушиванием в вакууме при температуре >105 °С до постоянной массы сухого остатка.

ОБОРУДОВАНИЕ

Лабораторный рефрактометр с термостатированием при 20 °С. Химические стаканы и пипетки.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

На призму рефрактометра в соответствии с паспортом по эксплуатации прибора наносят одну каплю жидкого гидролизата и измеряют показатель преломления.

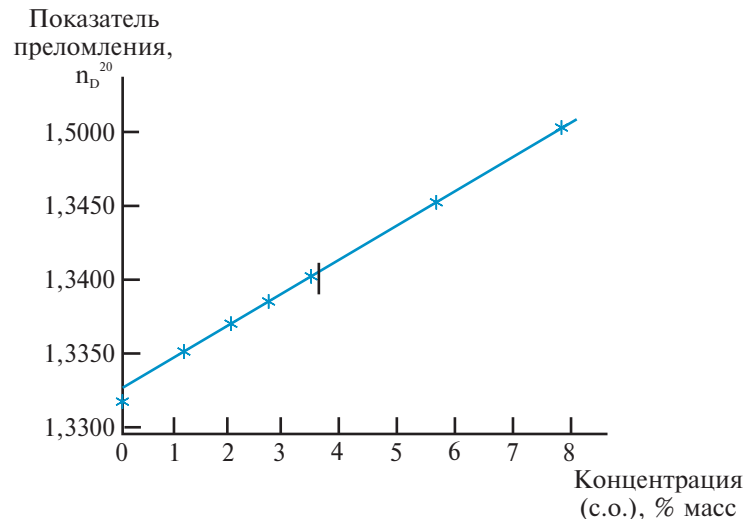


Рис. 6.1. Зависимость содержания сухого остатка в гидролизате в % масс. от показателя преломления при 20 °С (для воды $n_D^{20} = 1,333$)

Содержание сухих веществ (с.о.) в жидком гидролизате оценивают по градуировочному графику, который предварительно строят с использованием растворов (не менее 6 проб), в которых точно известно содержание сухих веществ. При построении градуировочного графика для каждого раствора с известным содержанием с.о. измеряют показатель преломления n_D^{20} и наносят точки на график (рис. 6.1).

Интервалы определения концентрации сухих веществ в воде данным методом могут составлять от 0 до 10% масс. Точность определения $\pm 0,5\%$.

6.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФОСФОРА. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ИСО

Фосфор является биоэлементом и, входя в состав фосфолипидов, нуклеиновых кислот и других биополимеров, является неотъемлемой частью химического состава живых клеток и используемых человеком продуктов питания. Среднее содержание фосфора в основных пищевых продуктах составляет (P, мг/100 г продукта): говядина 180–190, свинина 165–175, 195–210, яйцо 210–220, рыба 215–225, молоко коровье 92–97, животная кость — до 40%, овощи 25–60, фрукты 11–35, 580–600, кукуруза 280–300, пшеница 350–370.

Сущность метода определения фосфора (Р) заключается в высоко-температурном озолении продукта, с последующей обработкой азотной кислотой и спектрофотометрированием комплекса полученного продукта с монованадатом аммония и гептамолибдатом аммония при 430 нм.

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Мясорубка или измельчитель ткани. Термостат или водяная баня с регулируемой температурой нагрева 20–150 оС. Устройство для фильтрации через бумагу. Спектрофотометр на 430 нм. Колбы мерные вместимостью 100–1000 мл. Весы аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г. Пипетки мерные на 0,1–50 мл. Муфельная печь с регулируемой температурой нагрева 100–1000 оС. Все оборудование и посуда промывается моющими средствами, не содержащими фосфатов, и ополаскивается дистиллированной водой.

Кислота азотная хч, разбавленная водой (1:2), готовят смесь 1 объема 65% HNO_3 с 2 объемами дистиллированной воды. Вода дистиллированная. Монованадат аммония хч, 2,5 г/л раствор, готовят растворением 2,5 г NH_4VO_3 в 500 мл кипящей воды, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, добавляют 20 мл разбавленной 1:2 азотной кислоты и доводят объем раствора до метки. Гептамолибдат аммония хч, раствор 50 г/л, готовят растворением 50 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в 800 мл воды при температуре 50 оС, охлаждают, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора до метки. Дигидрофосфат калия KH_2PO_4 хч, высушенный при 103 оС в течение не менее 3 ч.

ПОДГОТОВКА К ОПРЕДЕЛЕНИЮ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОКРАШИВАЮЩЕГО РАСТВОРА

Смешивают 1 объем разбавленного (1:2) раствора HNO_3 и 1 объем 2,5 г/л раствора NH_4VO_3 . Цвет окрашивающего раствора изменяется от светло-желтого до бесцветного.

РАБОЧИЙ РАСТВОР ФОСФАТА

Растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 мл навеску 958,8 мг высушенного KH_2PO_4 и доводят объем раствора до метки. Раствор содержит 218 мг/л фосфора или 500 мг/л в пересчете на P_2O_5 .

СТАНДАРТНЫЕ РАСТВОРЫ ФОСФАТА (0,05–0,3 мг P_2O_5 /мл)

В мерные колбы вместимостью 100 мл вносят пипеткой 10, 20, 30, 40, 50, 60 мл рабочего раствора фосфата, содержащего 500 мг P_2O_5 /л,

добавляют в каждую колбу по 10 мл разбавленного (1:2) раствора HNO_3 и доводят объем раствора до метки.

Получают стандартные растворы с содержанием 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 и 0,3 мг P_2O_5 /мл. Срок хранения в холодильнике при +4 оС не более 7 сут.

КОНТРОЛЬНЫЙ РАСТВОР

Готовят смешением 2 мл разбавленного (1:2) раствора HNO_3 и 30 мл окрашивающего реактива в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки.

ГРАДУИРОВОЧНЫЙ ГРАФИК

В мерные колбы вместимостью 100 мл, вносят по 20 мл каждого стандартного раствора с содержанием 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 и 0,3 мг P_2O_5 /мл, прибавляют в каждую колбу по 30 мл окрашивающего реактива, доводят объем раствора до метки, получая растворы с концентрацией 10; 20; 30; 40; 50 и 60 мкг P_2O_5 /мл, перемешивают и выдерживают 15 мин.

Измеряют оптическое поглощение раствора при 430 ± 2 нм против контрольного раствора.

Строят зависимость оптической плотности растворов от концентрации стандартных растворов для каждой серии опытов.

ХОД ИСПЫТАНИЯ

Навеску 5 г измельченного образца подвергают минерализации в закрытом крышкой тигле, нагреванием при температуре 900 оС в течение 6 ч до постоянной массы образовавшейся золы.

Образовавшуюся золу растворяют в 10 мл разбавленного (1:2) раствора HNO_3 при температуре 100 оС, перемешивая >0,5 ч. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки водой и фильтруют через бумажный фильтр.

В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 20 мл прозрачного и бесцветного фильтрата, добавляют 30 мл окрашивающего реактива, доводят объем раствора до метки водой и выдерживают 15 мин.

Измеряют оптическое поглощение раствора при (430 ± 2) нм против контрольного раствора.

По градуировочному графику находят концентрацию фосфора в образце.

РАСЧЕТ

Содержание фосфора в пересчете на P_2O_5 (% масс.) определяют по формуле:

$$P = C / 20 \text{ g,}$$

где C — концентрация оксида фосфора (V), найденная по градуировочному графику, мкг/мл; g — масса навески образца, г.

Результаты определений рассчитывают до третьей значащей цифры и округляют до второго знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми (сходимость) не должно превышать 0,007% масс. При независимом определении — 0,0117% масс.

Минимальный уровень обнаружения P составляет 10 мкг P_2O_5 /мл.

6.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРИДОВ МЕТОДОМ ФОЛЬГАРДА.

СОДЕРЖАНИЕ ПОВАРЕННОЙ СОЛИ. СТАНДАРТНЫЙ МЕТОД ИСО

Хлор является макро биоэлементом и входит в виде хлорид аниона Cl^- в состав живых клеток и продуктов питания, содержание которого часто зависит в том числе и от процессов посола. Среднее количество хлоридов в основных пищевых продуктах составляет (Cl , мг/100 г продукта): говядина 60–70, свинина 48–70, птица 80–90, яйцо 150–155, рыба 150–165, молоко коровье 110–115, овощи 37–65, фрукты 1–5, соя 60–65, кукуруза 50–60, пшеница 35–67.

Сущность метода определения хлоридов (Cl) заключается в высокотемпературной экстракции водой и осаждении белков, с последующим добавлением к подкисленному экстракту избытка нитрата серебра и оттитровывании этого избытка раствором роданида.

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Мясорубка или измельчитель ткани. Термостат или водяная баня с регулируемой температурой нагрева 20–150 °С. Устройство для фильтрации через бумагу. Спектрофотометр или фотоколориметр на 430 нм. Пипетки мерные на 0,1–50 мл. Колбы мерные вместимостью 100–1000 мл. Весы аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г.

Бюретка для титрования вместимостью 25–50 мл. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 250 мл. Все оборудование и посуда промывается моющими средствами, не содержащими хлоридов, и ополаскивается безхлоридной дистиллированной водой. Эксикатор с цеолитом или прокаленным хлоридом кальция.

Вода дистиллированная, не содержащая галогенов, пробу на отсутствие Cl^- ионов проводят, добавляя к 100 мл воды 1 мл 0,1 М раствора $AgNO_3$ и 5 мл 4 М раствора HNO_3 . Кислота азотная хч, 4 М раствор, готовят смесь 1 объема 65% HNO_3 ($1,39 \text{ г/мл} \leq \rho \leq 1,42 \text{ г/мл}$) с 3 объемами дистиллированной воды. Нитробензол или гептиловый спирт. Уголь активированный. Гидроксид натрия хч, 1 М раствор.

Растворы для осаждения белков. Готовят раствор для осаждения белков А, растворяя 106 г $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ в 800 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора водой до метки. Раствор для осаждения белков готовят, растворяя 220 г ацетата цинка $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ в 800 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл, добавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем раствора водой до метки.

Нитрат серебра хч, 0,1 М титрованный раствор, готовят растворением в воде 16,989 г $AgNO_3$, предварительно высушенного в течение 2 ч при температуре 150 °С и охлажденного в осушающем эксикаторе, в 500 мл воды, переносят количественно в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора до метки. Раствор хранят в темной склянке в темноте.

Калия роданид хч, 0,1 М раствор, готовят растворением в воде 9,7 г $KSCN$ в 500 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора до метки. Стандартизируют раствор по 0,1 М раствору нитрата серебра, используя в качестве индикатора насыщенный раствор железоммонийных квасцов.

Квасцы железоммонийные чда, насыщенный раствор, получают растворением $>125 \text{ г/100 г}$ воды при комнатной температуре $NH_4[Fe(SO_4)_2] \cdot 12H_2O$.

ХОД ИСПЫТАНИЯ

Навеску 10 г измельченного образца смешивают при 100 °С со 100 мл воды в течение 15 мин, оставляют колбу для охлаждения до комнатной температуры, добавляют по 2 мл раствора $K_4[Fe(CN)_6]$ (раствор А) и $Zn(CH_3COO)_2$ (раствор Б), перемешивая и выдерживая смесь 0,5 ч. Смесь количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора до метки водой и фильтруют через бумажный фильтр.

Если в растворе присутствует аскорбиновая кислота в количестве более 0,1%, то к навеске добавляют 0,5 г активированного угля, а после добавления растворов А и Б, в содержимом колбы доводят рН до 8 путем добавления раствора NaOH.

В коническую колбу вместимостью 250 мл вносят 20 мл прозрачного фильтрата, добавляют 5 мл разбавленного раствора азотной кислоты и 1 мл насыщенного раствора железозамонийных квасцов (индикатор). В колбу вносят 20 мл раствора 0,1 М раствора нитрата серебра, 3 мл нитробензола или гептилового спирта и перемешивают до коагуляции осадка. Содержимое колбы титруют из бюретки 0,1 М раствором роданида калия до появления стойкого розового окрашивания.

Параллельно проводят контрольное титрование такого же объема раствора нитрата серебра.

РАСЧЕТ

Содержание хлоридов в пересчете на NaCl (P_{NaCl}, % масс.) определяют по формуле:

$$P_{\text{NaCl}} = 0,05844 \cdot (V_2 - V_1) \cdot 200/20 \cdot 100/g \cdot C = 58,44 \cdot (V_2 - V_1) \cdot C,$$

где C — концентрация раствора роданида калия, моль/л; g — масса навески образца, г; V₁ — объем раствора роданида калия, израсходованного на титрование пробы, мл; V₂ — объем раствора роданида калия, израсходованного на контрольное титрование, мл.

Результаты определений рассчитывают до второго знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми (сходимость) не должно превышать 0,15% масс. при содержании NaCl от 1 до 2% и 0,2% масс. при содержании NaCl > 2%. При независимом определении (воспроизводимость) — 0,2% масс. при содержании NaCl от 1 до 2% и 0,3% масс. при содержании NaCl > 2%.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ К ГЛАВЕ 6

1. Почему задача определения количественного содержания пищевой соли и фосфора является важной при оценке качества продукции пищевого назначения?

2. Какова точность определения содержания NaCl и P различными методами?

3. Почему в ряде аналитических процедур необходимо полное озоление пробы?

ГОСТ Р 51411–99 (ИСО 2171–93) Зерно и продукты его переработки. Определение зольности (общей золы).

Небел, Б. Наука об окружающей среде: как устроен мир: В 2-х т. Т. 1: Пер. с англ. — М.: Мир, 1993. — 424 с.

Нечаев, А. П., Витол, И. С. Безопасность продуктов питания. Учебное пособие. — М.: Изд-во МГУПП, 1999. — 87 с.

Нечаев, А. П., Скурихин, И. М. Все о пище с точки зрения химика. — М.: Высшая школа, 1991. — 287 с.

Химический состав пищевых продуктов: Книга 1: Справочные таблицы содержания основных пищевых веществ и энергетической ценности пищевых продуктов/ Под ред. И. М. Скурихина и М. Н. Волгарева. — М.: Агропромиздат, 1987. — 224 с.

Химический состав пищевых продуктов: Кн. 2: Справочные таблицы содержания основных пищевых веществ и энергетической ценности пищевых продуктов/ Под ред. И. М. Скурихина, М. Н. Волгарева — М.: Агропромиздат, 1987. — 256 с.

Определение содержания общего фосфора. Спектрофотометрический метод. ISO № 13730. — 1996.

Определение содержания хлоридов. ISO № 1841–1. — 1996.

Глава 7

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ТОКСИКАНТОВ В ОБЪЕКТАХ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Безопасность объектов природного происхождения для человека зависит во многом от содержащихся в этих объектах примесей опасных органических соединений. Контроль за их содержанием в биологических субстанциях, образцах пищи, лекарственных и косметических препаратах является важной задачей аналитической химии, которая реализуется сегодня в рамках национальных систем стандартизации и качества различных видов продукции.

7.1. МИКРОБНЫЕ ТОКСИНЫ (АФЛАТОКСИНЫ В₁, В₂, G₁, G₂, М₁)

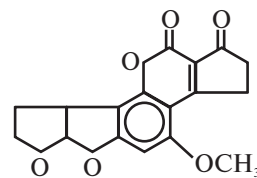
Микотоксины являются вторичными метаболитами микроскопических плесневых грибов. Ввиду достаточно широкой распространенности плесени в местах хранения продуктов питания и кормов опасность загрязнения продовольствия метаболитами высока.

Микробные токсины проявляют токсический эффект в очень малых концентрациях и способны быстро диффундировать в глубину продуктов.

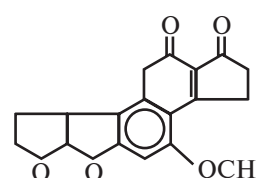
Известно около 120 микотоксинов, которые выделены из более чем 250 видов плесневых грибов. Наиболее часто встречаются афлатоксины, охратоксины, трихотеценовые микотоксины и зеараленон.

Микотоксины являются гепатотропными ядами, поражающими печень.

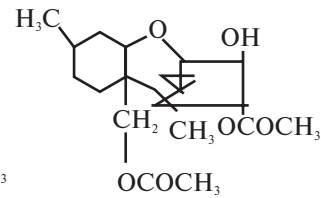
Имеются данные, что афлатоксины вызывают генные мутации, оказывают тератогенное действие, ослабляют иммунитет и являются сильными иммунодепрессантами.



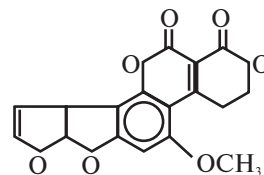
Афлатоксин В1



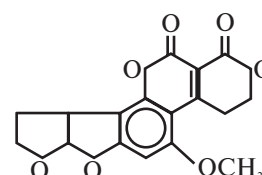
Афлатоксин В2



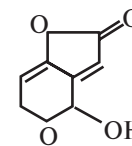
Токсин Т-2



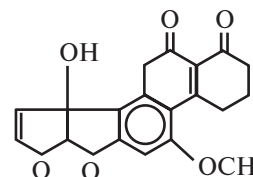
Афлатоксин G1



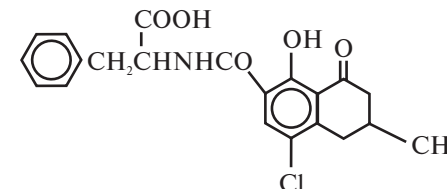
Афлатоксин G2



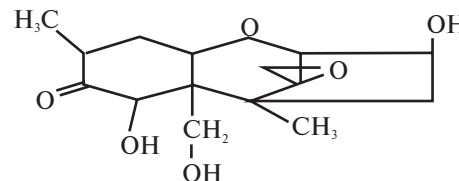
Патулин



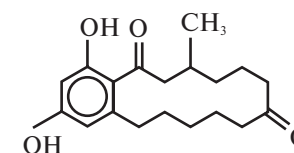
Афлатоксин М1



Охратоксин А



Дезоксиниваленон



Зеараленон

Наиболее часто микотоксины встречаются в продуктах растительного происхождения — кукурузе 0,5–600 мкг В₁/кг, 0–80 мкг В₂ и G₁/кг (частота обнаружения >4%), — пшенице 0–13 мкг В₁/кг (частота обнаружения >1%), — горохе 0,5–4 мкг В₁/кг (частота обнаружения >1%), —

жения >1,5%), — комбикормах 0–60 мкг В₁/кг (частота обнаружения >2%), — орехах 0,5–200 мкг В₁/кг (частота обнаружения >5%), — мясорастительных продуктах 0–10 мкг В₁/кг (частота обнаружения >1%). По отдельным районам более половины сельхозпродукции может быть загрязнено микотоксинами, особенно это характерно для тропических районов с влажным климатом.

Для афлатоксина В₁ ПДК в мясных и многих других пищевых продуктах установлена на уровне 5 мкг/кг, в молоке ПДК В₁—1 мкг/л, М₁—0,5 мкг/л. Для зерна и зернобобовых ПДК В₁—5 мкг/кг, ПДК зеареленона — 1 мг/кг, ПДК Т-2 токсина — 0,1 мг/кг, ПДК дезоксиниваленола — 1 мг/кг, патулина в овощах — 0,05 мг/кг.

В США для суммы афлатоксинов В₁ + G₂ ПДК в пищевых продуктах установлена 20 мкг/кг, в Бразилии для афлатоксинов — 30 мкг/кг, в Швеции — 20 мкг/кг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНОВ В₁, В₂, G₁, G₂, М₁ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Метод основан на экстракции афлатоксинов из образцов органическими растворителями с последующей очисткой экстракта и количественном определении методом жидкостной хроматографии.

Метод предназначен для анализа остаточных афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂, М₁ в пищевых продуктах растительного, животного и другого происхождения.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с. Микроизмельчитель ткани. Термостат с регулируемым нагреванием 20–200 °С.

Колбы перегонные вместимостью 50–1000 мл НШ29/32. Колбы конические плоскодонные вместимостью 250–500 мл НШ 29/32. Колбы мерные 2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В-56–80 ХС. Цилиндры мерные 1–50, 1–100, 1–250 с притертой пробкой. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стеклобанки с притертыми крышками, вместимостью 500, 1000 см³. Воронки делительные ВД-100–29/32, ВД-250–29/32. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1–10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Вата медицинская гигроскопическая, обезжиренная гексаном. Бумага фильтровальная лабораторная.

Жидкостной хроматограф с УФ и флуоресцентным детектором типа Biotronic HPLC Eppendorf-Biotronic (Германия) с колонкой ODS-5 мкм, 150 × 4 мм или другой хроматограф аналогичного класса. Спектрофотометр флуоресцентный типа МРФ-43А. Лампа УФ с длиной волны 370 нм.

Микрошприц для ввода 1–100 мкл пробы забором через клапан хроматографа. Устройство для фильтрования с фильтром 0,45 мкм.

Баллон стальной для сжатого гелия, номинальное давление 150 ат с редуктором и осушающими насадками с силикагелем.

Пластинки хроматографические «Силуфол», «Сорбфил» производства Чехии или «Merck» (ФРГ). Камера для хроматографирования: стеклянный сосуд с плоским дном, закрывающийся шлифованной крышкой. Распылитель стеклянный с грушей. Колонка стеклянная хроматографическая 30 × 2 см.

РЕАКТИВЫ

Ацетон хч, перегнанный. Кислота серная, плотностью 1,84 г/см³. Гексан ч, очищенный концентрированной серной кислотой, отмытый дистиллированной водой, высушенный кристаллическим гидроксидом калия и перегнанный с дефлегматором. Бензол хч. Ацетон хч. Изопропиловый спирт хч. Ацетонитрил хч, для ВЭЖХ. Метанол хч, для ВЭЖХ. Хлороформ хч, перегнанный. Этилацетат хч. Кислота уксусная, ледяная, хч. Эфир диэтиловый чда, профильтрованный через колонку с оксидом алюминия. Вода дистиллированная для ВЭЖХ. Кислота лимонная хч. Аммиак водный 25%, чда. Кислота азотная хч, концентрированная. Натрий сульфат безводный чда, экстрагированный гексаном и просушенный при 150 °С в течение 5 ч. Натрия хлорид хч, 10% раствор. Нитрат или ацетат свинца чда, 15% раствор. Окись алюминия для хроматографии 40/250. Силикагель марки АСК с частицами 100–250 мкм, измельченный и просеянный через сито 0,30 мм. Бумага индикаторная универсальная для определения рН. Эталоны афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂, М₁ гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%.

Растворы для дегазации: 10%-ный раствор хлорамина, 1% раствор натрия гидрокарбоната, 1% раствор борной кислоты.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Афлатоксины являются канцерогенными веществами. Все работы с ними проводятся под тягой с соблюдением правил безопасной работы с вредными и опасными химическими веществами. Детоксикацию афлатоксинов проводят обработкой 10%-ным раствором хлорамина,

затем 1% раствором натрия гидрокарбоната. При попадании на кожу пораженные участки промывают 1% раствором борной кислоты и водой. Работу с кристаллическими афлатоксинами и их растворами проводят в вытяжном шкафу с применением индивидуальных средств защиты (перчатки, маска и т.п.).

ОЧИСТКА ВАТЫ

В коническую колбу помещают хлопковую вату, заливают гексаном, выдерживают 15 мин. Операцию повторяют два раза. Очищенную вату сушат на воздухе под тягой. Хранят в закрытой стеклянной банке.

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КАМЕРЫ

В хроматографическую камеру за 1 ч до начала хроматографирования заливают смесь растворителей для насыщения ее парами. Объем растворителя в камере должен находиться на высоте не более чем 0,5 см от уровня дна.

ПОДГОТОВКА ПЛАСТИН ДЛЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Пластины для ТСХ типа «Силуфол» перед употреблением промывают. Для этого в хроматографическую камеру наливают систему растворителей бензол-этилацетат-уксусная кислота (100:50:1) или ацетон-аммиак (1:1) на высоту 5–7 мм и помещают туда пластинки в вертикальном положении. После того, как линия фронта растворителя поднимется, не доходя 10 мм до верха пластинки, ее вынимают, высушивают на воздухе, затем активируют в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 60 мин. Перед употреблением с вертикальных сторон пластинки удаляют слой в 3 мм, что способствует выравниванию фронта растворителя. Пластинки сохраняют в эксикаторе над осушителем.

ОЧИСТКА СИЛИКАГЕЛЯ АСК

В стакан насыпают силикагель, заливают гексаном, перемешивают, гексан сливают. Промывку повторяют три раза. Промытый силикагель прокаливают при температуре 180 °С в течение 2 ч. Хранят в плотно закрытой стеклянной банке.

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФА ВЭЖХ

Подготовку проводят в соответствии с техническим описанием хроматографа, получая на экране или регистрирующем устройстве устойчивую горизонтальную базовую линию при установленных параметрах записи хроматограммы.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНЫХ РАСТВОРОВ АФЛАТОКСИНОВ

Навески 1 мг кристаллических афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂, M₁ с соблюдением необходимых предосторожностей растворяют в мерных колбах в объеме 100 мл в смеси бензол-ацетонитрил (98:2) и получают растворы с концентрацией 10 нг/мкл.

Для получения рабочих растворов стандартов афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂, M₁ с концентрациями 0,5; 0,25; 0,2 и 0,1 нг/мкл соответственно в мерную колбу на 50 мл помещают 2,5; 1,25; 1,0; 0,5 мл стандартного раствора афлатоксина и доводят объем раствора до метки смесью бензол-ацетонитрил (98:2).

Для получения рабочей смеси стандартов афлатоксинов в мерную колбу вносят 2,5 мл стандартного раствора 10 нг/мкл афлатоксина В₁, 1,25 мл раствора В₂, 1 мл раствора G₁, 0,5 мл раствора G₂, 1 мл раствора M₁. Срок хранения стандартного раствора афлатоксинов при температуре 0 °С — 1 год.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ЭКСТРАКЦИЯ

Навеску 25 г измельченного образца помещают в плоскодонную коническую колбу вместимостью 250 мл, перемешивают с 25 мл 10% раствора хлорида натрия, добавляют 100 мл ацетона и встряхивают смесь в течение 30 мин. Смесь фильтруют через бумажный фильтр и отбирают 50 мл профильтрованного экстракта

ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА

К 50 мл фильтрата добавляют 20 мл 15% раствора ацетата свинца и 30 мл дистиллированной воды, перемешивают и оставляют стоять в темноте на 10 мин.

Смесь фильтруют через бумажный фильтр и отбирают 80 мл фильтрата.

Фильтрат обезжиривают в делительной воронке гексаном (2 × 30 мл), затем переэкстрагируют в хлороформ, добавляя 1-й раз 30 мл хлороформа, 2-й раз смесью хлороформ-ацетон, 3:1—45 мл. Объединенные хлороформные экстракты помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляют 7 г безводного сульфата натрия, встряхивают и оставляют стоять в темноте на 30 мин. Раствор фильтруют через вату, помещенную на химическую воронку в круглодонную колбу.

Осушенный и профильтрованный хлороформный экстракт упаривают на роторном испарителе до остаточного объема 1 мл и далее очищают колоночной хроматографией.

На пористое дно хроматографической колонки 30×2 см помещают кусочек ваты, затем слой 5 мм безводного сульфата натрия, наливают суспензию 2 г силикагеля в хлороформе, сверху насыпают слой 20 мм сульфата натрия, хлороформу дают стечь, затем на колонку наносят хлороформный экстракт образца и элюируют 60 мл смеси хлороформ-ацетон (9:1).

Элюат упаривают досуха на роторном испарителе.

Остаток растворяют в 2 мл хлороформа, фильтруют через бумажный фильтр в пробирку, упаривают или отдувают растворитель в токе инертного газа досуха, остаток растворяют в 400 мкл хлороформа (экстракт А).

ЖИРЫ И МАСЛА в количестве 15 г смешивают с 25 мл гексана, 5 мл 4% раствора хлорида натрия и 100 мл ацетонитрила и встряхивают смесь в течение 45 мин, затем отделяют нижний ацетонитрильный слой.

Ацетонитрильный экстракт обезжиривают в делительной воронке гексаном (3х50 мл), высушивают сульфатом натрия и упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл хлороформа и проводят очистку колоночной хроматографией.

На колонку с 4 г силикагеля наносят хлороформный экстракт, дают хлороформу стечь, промывают 10 мл смеси гексан-бензол-эфир (1:1:2). Афлатоксины элюируют 100 мл смеси хлороформ-ацетон (9:1). Элюат упаривают досуха. Остаток растворяют в 2 мл хлороформа, фильтруют через бумажный фильтр в пробирку, упаривают или отдувают растворитель в токе инертного газа досуха, остаток растворяют в 400 мкл хлороформа.

МОЛОКО в количестве 50 мл (5 г сухого молока) смешивают с 50 мл воды, 10 мл раствора, содержащего 2 г хлорида натрия и 0,24 г лимонной кислоты, 120 мл хлороформа при температуре 35°C , смесь встряхивают 3 мин и подвергают центрифугированию при 4000 G в течение 15 мин, отделяют нижний хлороформный слой, высушивают его над 10 г безводного сульфата натрия, отфильтровывают, измеряют объем экстракта V_{M_1} и упаривают его до 5 мл.

Проводят очистку экстракта колоночной хроматографией.

В колонку помещают 5 мм слой ваты, заливают суспензию 2 г силикагеля в гексане, сверху насыпают слой безводного сульфата натрия. Гексану дают стечь так, чтобы остался слой в 5 мл над слоем сульфата натрия.

На колонку наносят 5 мл хлороформного экстракта, дают хлороформу стечь, промывают 25 мл смеси толуол-уксусная кислота (9,5:0,5), 25 мл гексана и 25 мл смеси эфир-гексан-ацетонитрил (5:3:1). Афлатоксин M_1 элюируют с колонки 60 мл смеси хлороформ-ацетон (4:1).

Элюат упаривают досуха. Остаток растворяют в 2 мл хлороформа, фильтруют через бумажный фильтр в пробирку, упаривают или отдувают растворитель в токе инертного газа досуха, остаток растворяют в 200 мкл хлороформа.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ НАЛИЧИЯ АФЛАТОКСИНОВ ДВУМЕРНОЙ ТСХ

На хроматографическую пластинку в правый нижний угол на расстоянии 1,5 см от краев наносят 20 мкл (из 400 мкл) очищенного экстракта пробы. Разметку пластинки делают карандашом, проводя линии на 1,5 см от правого и нижнего края, 3 см — от верхнего края и 3,5 см от левого края.

В правом верхнем углу наносят 5 мкл рабочего раствора смеси афлатоксинов.

В левом нижнем углу на расстоянии 1,2 и 3 см от левого края и 1,5 см от нижнего края пластины наносят 2, 5 и 10 мкл рабочего раствора смеси афлатоксинов. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью эфир-метанол-вода (94:4,5:1,5) и проводят процесс хроматографирования в одном направлении до достижения фронтом растворителей линии, проведенной карандашом на расстоянии в 3 см от верхнего края пластинки.

Пластинку извлекают и сушат на воздухе в течение 5 мин, затем проводят хроматографирование в другом направлении, повернув пластинку вправо на 90° , в системе хлороформ-ацетон-вода (90:10:1). После достижения фронтом растворителя второй линии, проведенной карандашом, пластинку подсушивают на воздухе и рассматривают в УФ-свете.

Идентификацию афлатоксина M_1 проводят методом ТСХ, хроматографируя в 1-м направлении в системе эфир-метанол-вода (90:8:2), во втором направлении в смеси хлороформ-ацетон-изопропиловый спирт (85:10:5).

Наличие на пластинке пятен из экстракта, соответствующих по хроматографической подвижности и цвету флуоресценции пятнам стандартов афлатоксинов свидетельствует о возможном присутствии афлатоксинов в пищевом продукте.

Пластинку опрыскивают раствором азотной кислоты в воде (1:2) и рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Если цвет флуоресценции стандартов афлатоксинов изменился с синего (B_1 , B_2) или синезеленого (G_1 , G_2) на желтый, а цвет флуоресценции пятен экстракта не изменился на желтый, то афлатоксины в пробе отсутствуют. Изменение цвета флуоресценции пятен из экстракта на желтый свидетельствует о наличии афлатоксинов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНОВ В₁, В₂, G₁, G₂ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Условия хроматографирования: подвижная фаза эфир-метанол-вода 95:4:1, скорость потока 1 мл/мин. Для ВЭЖХ используют очищенные растворители квалификации «для ВЭЖХ», профильтрованные через фильтр 0,45 мкм.

Флуоресцентный детектор настраивают на длину волны возбуждающего излучения 360 нм и эмиссионную длину волны 418 нм. Чувствительность детектора устанавливают таким образом, чтобы пик сигнала введенного в хроматограф 1 нг афлатоксина В₁ соответствовал высоте пика на полную шкалу измерения экрана или самописца.

Для калибровки хроматографа с флуоресцентным детектором вводят 1 мкл рабочего раствора афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂ (соответственно 0,5 нг афлатоксина В₁, 0,25 нг афлатоксина В₂, 0,2 нг афлатоксина G₁ и 0,1 нг афлатоксина G₂), а также 2 мкл рабочего раствора афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂ (соответственно 1 нг афлатоксина В₁, 0,5 нг афлатоксина В₂, 0,4 нг афлатоксина G₁ и 0,2 нг афлатоксина G₂) и определяют площади соответствующих пиков.

Для хроматографической колонки типа «Ultrasphere SF» 25 × 0,46 см времена удержания афлатоксинов для В₁ составляет 9–10 мин, В₂ 11,0–11,8 мин, для G₁ 13–14 мин, для G₂ 15,6–17,0 мин в зависимости от состава подвижной фазы и времени уравнивания колонки.

При высоком содержании афлатоксинов (>10 мкг/кг по афлатоксину В₁) используют УФ-детектор.

Для калибровки хроматографа с УФ-детектором вводят 10 мкл рабочего раствора афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂ (соответственно 5 нг афлатоксина В₁, 2,5 нг афлатоксина В₂, 2 нг афлатоксина G₁ и 1 нг афлатоксина G₂), 15 мкл рабочего раствора афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂ (соответственно 7,5 нг афлатоксина В₁, 3,75 нг афлатоксина В₂, 3 нг афлатоксина G₁ и 1,5 нг афлатоксина G₂), 20 мкл рабочего раствора афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂ (соответственно 10 нг афлатоксина В₁, 5 нг афлатоксина В₂, 4 нг афлатоксина G₁ и 2 нг афлатоксина G₂) и определяют площади соответствующих пиков.

В инжектор хроматографа вводят 20 мкл очищенного экстракта (экстракт А).

Расчет концентрации афлатоксина X (мкг/кг) в пищевом продукте проводят с помощью автоматической программы обработки хроматографических данных по формуле: $X = V_1 \cdot V_3 \cdot V_5 \cdot m_{СТ} \cdot S / V_2 \cdot V_4 \cdot V_6 \cdot M \cdot S_{СТ}$, где V₁ – объем водно-ацетоновой смеси, мл (125 мл); V₂ – объем водно-ацетонового фильтрата, взятый для анализа, мл (50 мл); V₃ – объем водно-ацетонового фильтрата и раствора ацетата свинца, мл (100 мл); V₄ – объем фильтрата после очистки ацетатом свинца, мл (80 мл);

V₅ – объем очищенного раствора экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ, мл (400 мкл); V₆ – объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа, мкл (20 мкл); m_{СТ} – количество нг афлатоксина в введенном объеме стандарта, нг; S_{СТ} – площадь пика стандарта афлатоксина, мм² или условных единиц; S – площадь пика афлатоксина во введенном объеме экстракта, мм² или условных единиц; M – навеска продукта, г.

ПРИ АНАЛИЗЕ МАСЕЛ расчет концентрации афлатоксина X (мкг/кг) в масле проводят по формуле: $X = V_1 \cdot m_{СТ} \cdot S / V_2 \cdot M \cdot S_{СТ}$, где V₁ – объем очищенного раствора экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ (200 мкл); V₂ – объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа (20 мкл); m_{СТ} – количество нг афлатоксина в введенном объеме стандарта, нг; S_{СТ} – площадь пика стандарта афлатоксина, мм² или условных единиц; S – площадь пика афлатоксина во введенном объеме экстракта, мм² или условных единиц; M – навеска продукта, г.

АНАЛИЗ АФЛАТОКСИНА М₁ В МОЛОКЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Условия хроматографирования: подвижная фаза эфир-метанол-вода 90:8:2, скорость потока 1 мл/мин. Для ВЭЖХ используют очищенные растворители квалификации «для ВЭЖХ», профильтрованные через фильтр 0,45 мкм.

Флуоресцентный детектор настраивают на длину волны возбуждающего излучения 360 нм и эмиссионную длину волны 418 нм. Чувствительность детектора устанавливают таким образом, чтобы пик сигнала введенного в хроматограф 0,6 нг афлатоксина М₁ соответствовал высоте пика на полную шкалу измерения экрана или самописца.

Для калибровки хроматографа с флуоресцентным детектором вводят 1, 2, 3 мкл рабочего раствора афлатоксина М₁ (соответственно 0,2; 0,4; 0,6 нг афлатоксина М₁) и определяют площади пиков.

Для хроматографической колонки типа «Ultrasphere SF» 25 × 0,46 см время удержания афлатоксина М₁ составляет 8–9 мин в зависимости от состава подвижной фазы и времени уравнивания колонки.

При высоком содержании афлатоксинов (>10 мкг/кг по афлатоксину М₁) применяют УФ-детектор, используя для калибровки 10-кратные количества указанных стандартов.

В инжектор хроматографа вводят 20 мкл очищенного экстракта (экстракт А).

Расчет концентрации афлатоксина М₁ в молоке, X (мкг/кг) в пищевом продукте проводят с помощью автоматической программы об-

работки хроматографических данных по формуле: $X = V_1 \cdot V_3 \cdot m_{CT} \cdot S / V_2 \cdot V_4 \cdot M \cdot S_{CT}$, где V_1 — объем хлороформа взятого для экстракции, мл (120 мл); V_2 — объем хлороформного экстракта, взятого для анализа, мл; V_3 — объем очищенного экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ, мл (200 мкл); V_4 — объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа, мл (20 мкл); m_{CT} — количество нг афлатоксина M_1 в введенном объеме стандарта, нг; S_{CT} — площадь пика стандарта афлатоксина, мм² или условных единиц; S — площадь пика афлатоксина во введенном объеме экстракта, мм² или условных единиц; M — навеска продукта, г.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 30% по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания афлатоксинов любой пробы при допускаемых методом изменения влияющих факторов $\pm 0,15X$.

Минимальный уровень обнаружения по афлатоксину V_1 составляет для флуоресцентного детектора 0,1 нг в пробе, для УФ-детектора 1 нг во вводимой в хроматограф пробе (20 мкл), что соответствует 0,05 нг/мкл для УФ-детектора и 0,005 нг/мкл для флуоресцентного детектора при степени извлечения афлатоксинов из пробы 75–90%. Предел определения содержания афлатоксинов методом ТСХ и методом ВЭЖХ с УФ-детектором — 0,001 мг/кг, методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектором — 0,0002 мг/кг.

7.2. АНАЛИЗ АРОМАТИЧЕСКИХ И ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

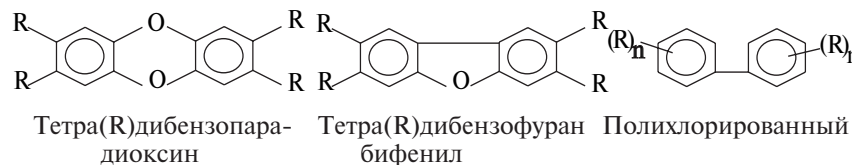
Среди обширной группы химических веществ, которые могут содержаться в продовольственном сырье и изделиях, ароматические токсиканты, в первую очередь диоксины, занимают особое место ввиду их высокой токсичности и достаточно широкой распространенности.

Источниками образования ароматических токсикантов являются химическая, целлюлозно-бумажная, металлургическая и нефтехимическая отрасли промышленности. Диоксины присутствуют в продуктах сгорания на тепловых электростанциях, в выхлопных газах автомобилей, а также хлорированной питьевой воде. Они образуются при пожарах на городских свалках и при уничтожении отходов в мусоросжигательных печах.

Диоксины являются общепризнанными наиболее токсичными веществами, они — самые токсичные из всех известных химических соединений. Диоксины во много раз более ядовиты, чем цианиды, яд кураре или боевые отравляющие вещества. Диоксин признан в мире как абсолютный яд.

Так, 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксин в 67000 раз токсичнее цианида калия KCN (ПДК_{KCN} в воздухе 0,009 мг/м³) и в 500 раз токсичнее ядовитого алкалоида стрихнина (летальная доза стрихнина 30–100 мг/кг, а ПДК 0,15 мг/м³ в США). Относительная токсичность диоксинов (условная LD₅₀) может быть записана в ряд: 2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксин — 1; 1,2,3,7,8-пентахлордибензодиоксин — 3; 1,2,4,7,8-пентахлор-дибензодиоксин — 1125; 2,3,7-трихлордибензодиоксин — 30000; 2,8-дихлордибензодиоксин — 300000.

На сегодня известно множество веществ, относящихся к группе диоксинов, отличающихся количеством и строением радикалов R (R = Cl, алифатический или ароматический радикал). Они химически прочны и полностью разрушаются только при высоких температурах (>1200 °C). Период полураспада в почве — 10–12 лет, в организме человека >7 лет. Благодаря высокой устойчивости во внешней среде они постоянно накапливаются в природе и организме человека.



К родственными химическим соединениям относятся полихлорированные дибензофураны (ПХДФ) и полихлорированные бифенилы (ПХБ). Они могут присутствовать одновременно с диоксинами в объектах окружающей среды, кормах и продуктах питания. В настоящее время выделено 135 ПХДФ и более 80 ПХБ. Все эти соединения — твердые кристаллические вещества, хорошо растворимые в органических растворителях и нерастворимые в воде. Они длительное время сохраняются в окружающей среде, медленно разлагаясь под действием ультрафиолетовых лучей, и накапливаются в жировой ткани млекопитающих.

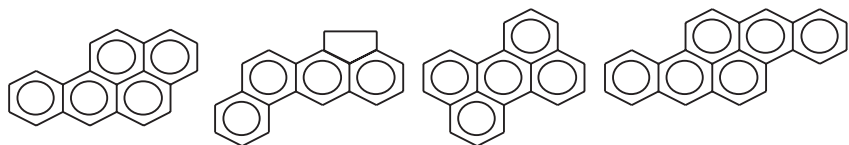
Диоксины встраиваются в клеточные структуры, нарушая и искажая их функции. Молекула диоксина может длительно не проявлять себя, а потом при изменении внешних факторов нарушить механизм наследственности. Результат — рак, врожденные уродства, потеря иммунитета.

Клинически отравление диоксином и родственными ароматическими соединениями может проявляться вначале в виде дерматита, затем появляются фурункулез, нарушения функции печени, желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, злокачественные новообразования и психические расстройства. В результате воздействия диоксинов на нервную систему развиваются невриты, нарушения слуха, обоняния, вкуса, астенический или депрессивный синдромы. Поражения передаются по наследству и распространяются на несколько поколений. Подавляющее большинство ароматических и полициклических ароматических углеводородов обладают выраженной кумулятивностью и высокой канцерогенностью.

Всемирной организацией здравоохранения установлен допустимый суточный уровень поступления диоксинов в организм человека в пересчете на тетрахлордиоксин (один из наиболее токсичных и хорошо изученных диоксинов, по которому рассчитывают суммарное токсическое действие ПХДФ и ПХБ), равный 10 пг/кг массы тела. Для человека массой 60 кг безопасная суточная доза диоксида 600 пг (пикограмм — одна миллионная от одной миллионной доли грамма). Учитывая, что достоверных научных данных, подтверждающих существование безопасной концентрации диоксинов нет, вопрос о ПДК диоксинов остается открытым.

К канцерогенным полициклическим углеводородам прежде всего относят бенз(а)пирен и похожие конденсированные структуры.

Полициклические ароматические углеводороды образуются в природе и попадают в объекты пищевых цепей за счет техногенных источников, прежде всего как результат сжигания при низких температурах углеводородного сырья, древесины, полимеров, пищи и др. Развитие неконтролируемых процессов неполного окисления приводит к тому, что в копченых продуктах (мясо, рыба), содержание бенз(а)пирена может превышать безопасные нормы.



Бенз(а)пирен Холантрен Перилен Дибенз(а)пирен

Содержание бенз(а)пирена (мкг/кг) в свежих говядине и свинине — отсутствует, вареной колбасе 0,2–0,5; колбасе копченой 0–2; колбасе полукопченой 0–7; рыбе 0–2; рыбе копченой 0,1–12; масле подсолнечном 1–30; масле подсолнечном рафинированном — отсутствует; кокосовом масле 15–45; овощах 1–25; сухофруктах 1–35.

ПДК бенз(а)пирена в воздухе составляет 0,001 мкг/м³, в воде 0,005 мкг/л, почве 0,2 мг/кг.

ПДК полихлорированных бифенилов, содержащихся в жировой ткани птицы, рыбы составляет 2–3 мг/кг, для рыбопродуктов — 5 мг/кг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Метод основан на экстракции полихлорированных бифенилов из образцов органическими растворителями (параллельно экстрагируются хлорорганические пестициды) с последующей очисткой серной кислотой, щелочным дегидрохлорированием и количественным определением методом газожидкостной хроматографии с электроннозахватным детектором.

Метод предназначен для анализа остаточных количеств полихлорированных бифенилов в пищевых продуктах животного и другого происхождения.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с. Микроизмельчитель ткани. Термостатируемая баня с регулируемым нагреванием 20–100 °С.

Колбы перегонные К-1–250–29/32. Колбы Гр-25–14/23. Колбы мерные 2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В-56–80 ХС. Колба коническая Кн-1–250–29/32. Цилиндры мерные 1–50, 1–100. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стеклянные банки с притертыми крышками, вместимостью 500, 1000 см³. Воронки делительные ВД-100–29/32, ВД-250–29/32. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1–10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Вата медицинская гигроскопическая, обезжиренная гексаном. Бумага фильтровальная лабораторная. Обратный холодильник Либиха на шлифах.

Газовый хроматограф Газохром 1109, Цвет 104 или аналогичный, например типа Varian, с детектором захвата электронов.

Микрошприц МШ 10 или аналогичный для ввода 0,1–20 мкл пробы закомом через мембрану инжектора хроматографа.

Колонки хроматографические стеклянные для газового хроматографа длиной 2,0 м и диаметром 3 мм.

Баллон стальной для сжатого газа, номинальное давление 150 ат.

Азот газообразный, марки «особой чистоты» или азот с содержанием кислорода не более 0,004% или гелий.

Насадки для колонки (наполнение набивных колонок): 5% OV-17 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм), 3% OV-210 на хроматоне N-супер (0,125–0,16 мм) или 5% SE-30 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм) или капиллярная колонка в соответствии с документацией к газовому хроматографу.

РЕАКТИВЫ

Кислота серная, плотностью 1,84 г/см³ и 1% раствор. Гексан ч, очищенный концентрированной серной кислотой, отмытый дистиллированной водой, высушенный кристаллическим гидроксидом калия и перегнанный с дефлегматором, или хч. Ацетон хч, перегнанный. Диэтиловый эфир чда. Спирт этиловый ректификованный технический. Натрия сульфат безводный, хч, экстрагированный гексаном и просушенный при 150 °С в течение 5 ч. Калия гидроксид хч, экстрагированный очищенным гексаном. Дистиллированная вода. Индикаторная бумага рН.

Эталоны полихлорированных бифенилов гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%, основной раствор 1 мг/мл, рабочий раствор 3 мкг/мл.

Эталонные растворы хлорорганических пестицидов. Основной раствор, содержащий 100 мкг/мл ДДТ, ДДЭ, ДДД, 20 мкг/мл γ -ГХЦГ. Рабочий раствор, содержащий 0,1 мкг/мл ДДТ, ДДЭ, ДДД, 0,02 мкг/мл γ -ГХЦГ.

Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

ОЧИСТКА ВАТЫ. В коническую колбу помещают хлопковую вату, заливают гексаном, выдерживают 15 мин. Операцию повторяют два раза. Очищенную вату сушат на воздухе под тягой. Хранят в закрытой стеклянной банке.

ПОДГОТОВКА ГАЗОВОГО ХРОМАТОГРАФА

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ

Сухую стеклянную колонку, предварительно промытую хромовой смесью, этиловым спиртом, затем диэтиловым эфиром, заполняют носи-

телем с помощью вакуумного или водоструйного насоса. При этом набивку колонки периодически уплотняют, постукивая по колонке деревянной палочкой. Установленную в термостате хроматографическую колонку перед работой кондиционируют в следующем режиме: 2 ч при 100 °С; 2 ч при 150 °С; 4 ч при 200 °С; 4 ч при 250 °С. При кондиционировании колонка должна быть отключена от детектора. Кондиционирование следует проводить при смене колонки, а также после длительных перерывов в работе. При использовании капиллярной колонки проводят ее подготовку в соответствии с технической документацией к прибору.

ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

10 г яичного желтка или измельченных мясных или других пищевых продуктов смешивают в колбе на 250 мл с 100 мл ацетона, встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 1 ч. Экстракт фильтруют в круглодонную колбу на 500 мл через воронку с обезжиренной ватой. Остаток в колбе промывают ацетоном порциями 3 × 20 мл и сливают в колбу через ту же воронку. Ацетон из экстракта отгоняют на роторном испарителе при температуре 25 °С. Остаток в колбе, содержащий полихлорированные бифенилы, подвергают экстракции гексаном двумя порциями по 20 мл, встряхивая смесь в течение 5 мин и разделяя слои с помощью делительной воронки. Объединенный гексановый экстракт подвергают очистке серной кислотой.

Топленые жиры, масла растворяют в 40 мл гексана в делительной воронке и используют для последующей очистки серной кислотой.

Гексановый экстракт осторожно смешивают в делительной воронке с 20 мл концентрированной серной кислоты, сернокислотный слой отбрасывают, отмывку гексанового слоя кислотой повторяют несколько раз до получения бесцветного слоя кислоты. Очищенный кислотой гексановый экстракт промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод, помещают в колбу с безводным сульфатом натрия для обезвоживания, гексан сливают с осушителя в круглодонную колбу, осушитель дополнительно промывают сухим гексаном, промывной гексан добавляют к основному количеству очищенного экстракта и упаривают на роторном испарителе до остаточного объема 2–3 мл, раствор пипеткой переносят количественно в градуированную пробирку и доводят объем гексаном до 4 мл (экстракт 1).

Аликвоту 2 мл раствора обрабатывают щелочью, смешивая их с 0,5 г тв. гидроксида калия и 2 мл этилового спирта в круглодонной колбе на 10 мл с обратным холодильником при температуре 55 °С в течение 0,5 ч. Смесь охлаждают, количественно переносят в делительную воронку, смешивают с 4 мл дистиллированной воды. Водно-спир-

товый слой отбрасывают, гексановый слой промывают 1% раствором серной кислоты до нейтральной реакции промывных вод, фильтруют через воронку с 3 г сульфата натрия смоченного гексаном в круглодонную колбу, слой сульфата натрия промывают дополнительно порциями по 3 × 5 мл сухого гексана, объединяя гексановые растворы. Гексановый экстракт упаривают до объема 2 мл и используют для газохроматографического анализа (раствор 2).

УСЛОВИЯ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

5 мкл гексанового экстракта не обработанного щелочью (экстракт 1), содержащего экстрагированные из пробы по методике хлорорганические пестициды и изомеры полихлорированных бифенилов, вводят в испаритель газового хроматографа с электронно-захватным детектором и анализируют при температуре колонки 180 °С, температуре испарителя 250 °С, температуре детектора 250 °С, расход инертного газа на колонку 75 мл/мин.

При тех же условиях анализируют гексановый экстракт, обработанный щелочью (раствор 2), содержащий экстрагированные из пробы по методике хлорорганические пестициды и продукты трансформации изомеров полихлорированных бифенилов в соответствующие пестициды.

Для проведения количественного анализа полихлорированных бифенилов строят калибровочные графики для смеси полихлорированных бифенилов (пики соответствующие по временам выхода всем основным пикам от 7 мин (ДДД) до 12 мин (ДДТ) по сумме высот пиков В°, С°, D°) и для каждого пестицида, вводя в хроматограф 0,25, 0,5, 1, 5 мкл стандартных рабочих растворов 3 мкг/мл полихлорированных бифенилов, а также рабочих растворов, содержащих 0,1 мкг/мл ДДТ, ДДЭ, ДДД, 0,02 мкг/мл γ-ГХЦГ.

Строят график зависимости величин площадей пиков полихлорированных бифенилов, ДДТ, ДДЭ, ДДД, γ-ГХЦГ от суммарного количества введенных в хроматограф полихлорированных бифенилов или каждого пестицида.

По сумме площадей пиков В², С², D² с помощью калибровочного графика находят соответствующее этой сумме количество полихлорированных бифенилов.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание полихлорированных бифенилов X мг/кг, в анализируемом сырье вычисляют автоматически в соответствии с градуировочными графиками по формуле:

$$X = m_1 \cdot V_1 / m_2 \cdot V_2,$$

где m_1 — масса полихлорированных бифенилов, найденная по градуировочному графику, мкг; V_1 — общий объем раствора, из которого взята аликвота для хроматографирования, мл; m_2 — масса анализируемой пробы, г; V_2 — объем аликвоты, вводимой в хроматограф, мкл.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 30% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания определяемых веществ в любой пробе при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов $\pm 0,20X$.

Минимальный уровень обнаружения полихлорированных бифенилов составляет для яичного желтка 0,6 мг/кг, куриного жира и мясных продуктов 0,5 мг/кг.

7.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕНЗ(А)ПИРЕНА И ДРУГИХ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Метод основан на экстракции гексаном бенз(а)пирена и других полициклических ароматических углеводородов из неомыляемой фракции липидов из смеси, получаемой в результате обработки образцов спиртовым раствором щелочи с последующей хроматографической очисткой экстракта и количественной идентификацией с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и спектрофлуориметрии, а также методом тонкослойной хроматографии.

Метод предназначен для анализа остаточных количеств полициклических ароматических углеводородов в пищевых продуктах животного и другого происхождения.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с погрешностью взвешивания не более 0,0002 г. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АБУ-6с. Микроизмельчитель ткани. Термостатируемая баня с регулируемым нагреванием 20–100 °С. Печь муфельная для нагревания >600 °С. Мешалка магнит-

ная. Камера хроматографическая стеклянная 40 × 40 × 40 см с притертой крышкой. Пластины хроматографические стеклянные 20 × 20 см.

Воронка Бюхнера. Колбы перегонные вместимостью 100–1000 мл. Колбы каплевидные для вакуумной перегонки вместимостью 50–100 мл. Колбы мерные 2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В-56–80 ХС. Колбы конические плоскодонные вместимостью 50–1000 мл. Цилиндры мерные 1–50, 1–100, 1–250. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Аллонж вакуумный. Каплеуловитель. Стеклянные банки с притертыми крышками, вместимостью 500, 1000 см³. Воронки делительные вместимостью 500–1000 мл типа ВД-1000–29/32, ВД-500–29/32. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1–10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Вата медицинская гигроскопическая, обезжиренная гексаном. Бумага фильтровальная лабораторная. Обратный холодильник Либиха на шлифах длиной 40 см. Воронки Шотта с пористым фильтром № 1 и № 3. Колонки хроматографические стеклянные длиной 500 мм и диаметром 10–15 мм с нижним пористым фильтром N3.

Жидкостной хроматограф с УФ и флуоресцентным детектором типа Biotronic HPLC Eppendorf-Biotronic (Германия) с колонкой ODS-5 мкм, 150 × 4 мм. Спектрофотометр флуоресцентный типа MPF-43A. Лампа УФ с длиной волны 370 нм.

Микрошприц для ввода 1–100 мкл пробы закомом через клапан хроматографа. Устройство для фильтрования с фильтром 0,45 мкм.

Баллон стальной для сжатого гелия, номинальное давление 150 ат с редуктором и осушающими насадками с силикагелем.

РЕАКТИВЫ

Калия гидроксид, хч, экстрагированный очищенным гексаном. Натрия сульфат безводный, хч, экстрагированный гексаном и просушенный при 450 °С в течение 5 ч. Кислота серная, плотностью 1,84 г/см³ и 1% раствор. Гексан ч, очищенный концентрированной серной кислотой, отмытый дистиллированной водой, высушенный кристаллическим гидроксидом калия и перегнанный с дефлегматором или хч. Хлороформ хч, перегнанный. Спирт этиловый ректифицированный технический. Дистиллированная вода HPLC. Бензол хч. Уксусный ангидрид чда. Ацетонитрил осч для HPLC. Сефадекс типа LH20 «Pharmacia» (Швеция). Диметилформамид чда. Целлюлоза микрокристаллическая ацетилованная «Aldrich» (США) или «Chemapol» (Чехия). Индикаторная бумага рН.

Стандарты: пирен, бенз(а)антрацен, хризен, бенз(к)флуорантен, бенз(б)флуорантен, бенз(а)пирен, бенз(е)пирен, дибенз(а, h)антрацен, бенз(б)хризен «Serva» (Германия).

Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Органические растворители подвергают перегонке. Диметилформамид смешивают с 30 мл бензола и 12 мл воды на 250 мл растворителя и собирают фракцию с температурой кипения 153 °С. Для хроматографии ВЭЖХ растворители подвергают фильтрации через фильтр 0,45 мкм.

Получение ацетилованной целлюлозы.

Микрокристаллическую целлюлозу марки «Chemapol» (Чехия) в количестве 50 г смешивают в колбе вместимостью 500 мл с раствором 150 мл бензола, 70 мл уксусного ангидрида и 0,3 мл концентрированной серной кислоты, смесь перемешивают при 20 °С в течение 24 ч, жидкость сливают, а осадок заливают 200 мл этанола и выдерживают при той же температуре в течение 24 ч. Полученный осадок продукта отделяют на воронке Бюхнера, промывают 100 мл этанола, дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод (200 мл воды) и сушат на воздухе.

ПЛАСТИНКИ С АЦЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

5 г ацетилованной целлюлозы суспензируют в 20 мл этанола и ровным слоем выливают на поверхность стеклянной пластинки, которую высушивают на воздухе.

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КАМЕРЫ

В хроматографическую камеру за 2 ч до начала хроматографирования заливают смесь растворителей для насыщения ее парами. Объем растворителя в камере должен находиться на высоте не более чем 0,5 см от уровня дна. Для лучшего насыщения дно и боковые стенки камеры покрывают фильтровальной бумагой.

СЕФАДЕКС

10 г Сефадекса LH20 заливают 50 мл этанола и оставляют набухать в течение 4 ч. Набухший сорбент переносят в колонку, оставляя над слоем сорбента слой этанола во избежание пересыхания сефадекса.

ЭТАЛОННЫЕ РАСТВОРЫ

Исходные растворы полициклических ароматических углеводородов готовят растворением навески 20 мг вещества в бензоле в объеме мерной колбы на 100 мл.

Для ВЭЖХ готовят соответствующим разбавлением исходных бензольных растворов полициклических ароматических углеводородов в ацетонитриле до концентрации (мкг/мл): пирен — 10, бенз(а)антрацен — 10, хризен — 20, бенз(к)флу-орантен — 1, бенз(б)флуорантен — 1, бенз(е)пирен — 10, бенз(а)пирен — 1, дибенз(а, h)антрацен — 2.

Концентрация раствора внутреннего стандарта для ВЭЖХ бенз(б)хризена — 0,1 мкг/мл бензола.

Концентрация раствора сравнения для флуориметрии — 20 нг/мл бензола.

ПРОВЕДЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

ГИДРОЛИЗ И ЭКСТРАКЦИЯ

50 г измельченного продукта помещают в плоскодонную колбу вместимостью 1000 мл, добавляют 20 г КОН и 250 мл этилового спирта, а также вносят внутренний стандарт в количестве 100 мкл 0,1 мкг/мл раствора в бензоле бенз(б)хризена. Колбу кипятят с обратным холодильником, перемешивая содержимое, в течение 3 ч.

Раствор отделяют от осадка на фильтре, промывают осадок горячим этанолом (50 мл), смешивают с 350 мл дистиллированной воды при 20 °С и экстрагируют 3 раза по 150 мл гексана, добавляя для расслоения в смесь по 1 г сульфата натрия. Экстракты объединяют, промывают водой (3 × 50 мл) и фильтруют через слой безводного сульфата натрия на воронке с пористой перегородкой. Полученный раствор в гексане упаривают до объема 100 мл.

Упаренный раствор смешивают в делительной воронке с 100 мл смеси диметилформамид — вода (9:1) в течение 1 мин, нижний слой переносят в плоскодонную колбу, верхний слой подвергают повторному экстрагированию 10 мл смеси диметилформамид — вода (9:1). Гексановый верхний слой отбрасывают. Нижние объединенные слои смешивают с 200 мл воды и экстрагируют гексаном (3 × 75 мл). Объединенные гексановые слои промывают водой (4 × 50 мл) и обезвоживают, выдерживая над безводным Na₂SO₄ (30 г) в течение 1 ч.

Экстракт упаривают на роторном испарителе досуха в токе инертного газа и растворяют в 1 мл этанола.

ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА НА СЕФАДЕКСЕ

1 мл спиртового раствора количественно переносят на колонку 15 × 500 мм с подготовленным сефадексом LH20, осторожно сливают с колонки растворитель до верхнего края геля, давая растворителю полностью впитаться в слой сорбента и элюируют вещество с колонки этанолом, со скоростью 0,5 мл/мин, обеспечивая поток поддувом сжатого газа на колонку через силикагелевый патрон. Первую фракцию в количестве 50 мл отбрасывают, а вторую фракцию в количестве 100 мл собирают в колбу и упаривают на роторном испарителе досуха в токе инертного газа.

Остаток для проведения тонкослойной хроматографии растворяют в 1 мл бензола.

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕНЗ(А)ПИРЕНА ИЗ ФРАКЦИИ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Полученный раствор сплошной полосой с шириной 0,5 см наносят на хроматографическую пластинку. На расстоянии 2 см от нее на том же уровне наносят касанием микропипетки точку 2 мкл раствора 1 мкг/мл бенз(а)пирена.

Пластинку помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителя и проводят хроматографирование в смеси этанол-ацетон-вода (60:25:15). По достижении фронтом растворителя расстояния в 2 см от верхнего края пластины, ее вынимают и проявляют зону бенз(а)пирена на боковом поле (нанесение 2 мкл стандарта) в УФ свете. R_f бенз(а)пирена в данной системе растворителей составляет 0,1. Определив точное месторасположение бенз(а)пирена из основного раствора, нанесенного на пластинку полосой, сорбент из зоны основного поля пластинки, соответствующей бенз(а)пирену, собирают на воронку Шотта, элюируют бензолом (5 × 5 мл) в круглодонную колбу и упаривают на роторном испарителе досуха в токе инертного газа.

Для спектрофлуориметрического анализа остаток растворяют в 1 мл бензола.

Для анализа методом ТСХ остаток растворяют в 200 мкл бензола.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Сухой остаток, полученный после упаривания основной спиртовой фракции с колонки с сефадексом растворяют в 300 мкл ацетонитрила и в количестве 20 мкл вводят в подготовленный в соответствии

с техническим описанием жидкостной хроматограф с флуоресцентным детектором.

В автоматическом режиме записывают хроматограмму при длине волны возбуждения 300 нм и эмиссионной длиной волны 418 нм. Элюент ацетонитрил-вода (8:2), поток 2 мл/мин.

Для хроматографа «Altex-334» с флуоресцентным детектором «KratosFS-970» и колонкой 4,6 × 150 мм Supelcosit LC-PAH 5 мкм время удерживания бенз(а)пирена — 5 мин, бенз(б)хризена — 13 мин.

РАСЧЕТ

Расчет содержания компонентов смеси в образце X (мкг/кг) проводят по формуле:

$$X = M \cdot S_1 \cdot K \cdot 1000 / S_2 \cdot G,$$

где M — количество введенного внутреннего стандарта, мкг; S₁ и S₂ — площади пиков определяемого компонента и внутреннего стандарта; G — навеска образца, г; K — калибровочный коэффициент, определяемый экспериментально. Для указанных условий определения K составляет: бенз(б)хризен — 1, пирен — 119, бенз(а)антрацен — 101, хризен — 274, бенз(е)пирен — 107, бенз(к)флуорантен — 10, бенз(б)флуорантен — 12, бенз(а)пирен — 8, дибенз(а, h)антрацен — 17.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 40% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания углеводородов любой пробы при допустимых методом изменения влияющих факторов ± 0,2X.

Минимально обнаруживаемая концентрация бенз(а)пирена в хроматографируемой пробе составляет 0,2 мкг/кг.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЕЙ

Анализируют фракцию бенз(а)пирена в 1 мл бензола, полученную после выделения методом тонкослойной хроматографии. Записывают спектр флуоресценции раствора при длине волны возбуждения 386 нм в диапазоне от 400 до 450 нм. Измеряют интенсивность флуоресценции при 406 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор

бенз(а)пирена в бензоле с концентрацией 50 нг/мл, проведенный через все стадии выделения («холостой опыт» с добавкой 50 нг бенз(а)пирена). Спектры записывают в одинаковых условиях, проводя при необходимости соответствующее разбавление.

Для подтверждения чистоты выделенной фракции бенз(а)пирена записывают также спектры возбуждения при длине волны эмиссионного света 406 нм в диапазоне 280–390 нм.

Расчет содержания компонентов смеси в образце X (мкг/кг) проводят по формуле:

$$X = C \cdot Y_1 \cdot V \cdot 1000 / Y_2 \cdot G,$$

где C — концентрация раствора стандарта, мкг/мл; Y₁ и Y₂ — интенсивность флуоресценции растворов образца (1) и стандарта (2); G — навеска образца, г; V — объем пробы, мл.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 40% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания определяемых веществ любой пробы при допустимых методом изменения влияющих факторов ± 0,2X.

Минимально обнаруживаемая концентрация бенз(а)пирена в хроматографируемой пробе составляет 0,2 мкг/кг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕНЗ(А)ПИРЕНА МЕТОДОМ ТСХ

Анализируют фракцию бенз(а)пирена в 200 мкл бензола, полученную после выделения методом тонкослойной хроматографии.

На хроматографическую пластинку с интервалом в 2 см наносят микрошприцем по 10 и 20 мкл раствора образца, а также 2,5 и 5 мкл раствора стандарта с концентрацией бенз(а)пирена 1 мкг/мл.

Пластинку помещают в камеру для тонкослойной хроматографии и проводят хроматографирование в смеси этанол-ацетон-вода (60:25:15), давая подняться растворителю на 10 см.

Пластинку высушивают и подвергают УФ-облучению с максимумом эмиссии 365 нм.

Сравнивают интенсивность флуоресценции пятен образца и стандарта. В данных условиях возможно определение содержания бенз(а)пирена не менее 2,5–5 нг в одном пятне, что соответствует его концентрации 0,5–1 мкг/кг массы образца. При более высоком содержании

бенз(а)пирена проводят разведение раствора и в результате хроматографирования устанавливают границу между отсутствием флуоресценции пятна и его устойчивым свечением, соответствующим 2,5–5 нг бенз(а)пирена в одном пятне.

Расчет содержания бенз(а)пирена в образце X (нг/кг) проводят по формуле:

$$X = 2,5 \cdot Y \cdot 1000 / V \cdot G,$$

где 2,5 — нижняя граница определения бенз(а)пирена в пятне (2,5 мкл раствора сравнения с концентрацией 1 мкг/мл); Y — объем раствора образца, мкл; V — объем раствора нанесенной пробы, мкл; G — навеска образца, г.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 60% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания определяемых веществ любой пробы при допусках методом изменения влияющих факторов $\pm 0,2X$.

Минимальная концентрация бенз(а)пирена, определяемая данным методом, составляет 0,5 мкг/кг.

7.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ТОКСИКАНТОВ (НИТРАТЫ, НИТРИТЫ, НИТРОЗАМИНЫ, БИОГЕННЫЕ АМИНЫ, ГИСТАМИН)

Нитраты являются нормальными метаболитами любого живого организма. В организме человека за сутки образуется и метаболизируется в обменных процессах в среднем >100 мг нитратов. Существенное превышение этого уровня, в частности одноразовый прием нитратов 1–4 г внутрь вызывает острое отравление, а доза в 10–15 г считается смертельной (5 мг/кг массы тела). ПДК нитратов в питьевой воде составляет 45 мг/л.

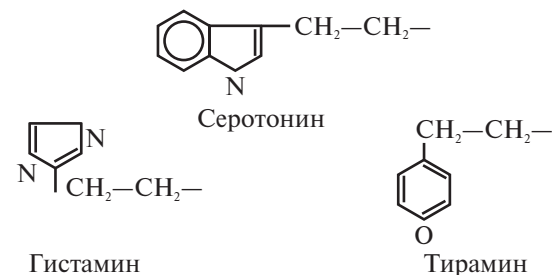
Превышение нормального уровня содержания нитратов, прежде всего в пищеварительной зоне, приводит к развитию реакции образования нитритов: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$, существенно более токсичных для живого организма за счет конкурентного связывания с гемоглобином и образования метгемоглобина, не способного связывать и переносить кислород. 1 мг NaNO_2 переводит в мет-Нв до 2000 мг гемоглобина. Пороговая доза для нитрита составляет 0,2 мг/кг, острая интоксикация отмечается при разовой дозе в 300 мг, летальный исход может на-

ступить при дозе в 500–2500 мг. Токсичность нитритов проявляется во влиянии на многие процессы, в том числе и на снижение уровня содержания витаминов. ПДК нитритов питьевой воде по требованиям ВОЗ 3 мг/л.

Повышенное содержание нитритов в присутствии аминогрупп белков может приводить к образованию N-нитрозаминов: $\text{HONO} + \text{R}_2\text{NH} \rightarrow \text{R}_2\text{N} - \text{N} = \text{O} + \text{H}_2\text{O}$. Образуются нитрозамины различного строения в зависимости от R, 80% которых являются канцерогенами.

Наиболее распространенными нитрозосоединениями являются N-нитрозодиметиламин (НДМА), N-нитрозодиэтиламин (НДЭА), N-нитрозодипропиламин (НДПА), N-нитрозодибутиламин (НДБА), для которых величина ПДК установлена 0,002 мг/кг (сумма НДМА и НДЭА).

Источником поступления нитратов и нитритов в первую очередь являются растительные продукты, как результат широкого применения минеральных удобрений. Содержание нитратов в овощах составляет в среднем 2–7000 мг/кг, в зерновых 1–20 мг/кг, в мясных продуктах 0,1–6 мг/кг, рыбных продуктах 3–40 мг/кг, молочных продуктах 1–15 мг/кг, ягодах 2–4 мг/кг.



Повышенное содержание нитрита в некоторых мясных продуктах обусловлено широким применением нитрита натрия в качестве консервирующей добавки, придающей мясным изделиям сочный товарный вид.

Наличие нитритов в мясных продуктах на уровне 0,2–185 мг/кг, особенно в копченых изделиях, может способствовать развитию образования нитрозаминов, которые даже при соблюдении нормативных рецептур могут обнаруживаться в мясных изделиях в количестве от 0,1 до 30 мкг/кг.

К биогенным аминам относятся органические N-содержащие продукты биохимических превращений продуктов расщепления белков и нуклеиновых кислот, прежде всего биогенных аминов, таких как серотонин, тирамин, гистамин, которые проявляют сосудосуживающее действие

у млекопитающих и при превышении ПДК представляют опасность для организма человека.

Серотонин содержится в фруктах и овощах, например в сливах и томатах 10–12 мг/кг. Тирамин может содержаться в сыре от 10 до 1000 мг/кг. Содержание гистамина в рыбных, твердых молочных и других продуктах, особенно с просроченными сроками хранения, может составлять 10–2500 мг/кг. Количества более 100 мг/кг представляют угрозу для здоровья человека.

ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СОПУТСТВУЮЩИХ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ

Метод основан на экстракции нитритов водой, очистке экстракта и фотометрическом измерении интенсивности окраски азосоединения с ароматическими аминами.

Определение нитратов основано на экстракции их водой, очистке экстракта, восстановлении нитратов до нитритов на пористом кадмии и фотометрическом измерении интенсивности окраски азосоединения с ароматическими аминами.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности и пределом допустимой погрешности 0,2 мг. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стекланные банки с притертыми крышками, вместимостью 500, 1000 мл. Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с. Пипетки 1–2–5–10–25 см³.

Бумага фильтровальная лабораторная. Фотометр или спектрофотометр для измерения оптической плотности при 540 ± 20 нм (зеленый светофильтр). рН-метр. Термостат или сушильный шкаф на 20–250 °С. Микрогомогенизатор для измельчения образцов. Колонка хроматографическая 2 × 50 см.

Цилиндры мерные 10–25–50–100–250–500–1000 см³. Колбы конические, колбы мерные, стаканы химические вместимостью 10–25–50–100–250–500–1000 см³. Воронки химические. Палочки стеклянные.

РЕАКТИВЫ

Калий ферроцианид (II) K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O хч. Кадмия сульфат или хлорид 3CdSO₄·8H₂O или CdCl₂·2H₂O хч. Нитрат калия KNO₃

хч. Нитрат серебра AgNO₃ хч. Кислота соляная концентрированная хч. Кислота уксусная ледяная CH₃COOH. Сульфат меди CuSO₄·5H₂O чда. Натрия нитрит NaNO₂ хч. Натрия гидроксид хч. Этилендиаминатетрацетата динатриевая соль (трилон Б) Na₂C₁₀H₁₄N₂O₈·2H₂O чда. Сульфат цинка ZnSO₄·7H₂O чда. Ацетат цинка Zn(CH₃COOH)₂·2H₂O чда. Аммиак водный 25% раствор чда. Цинк гранулированный металлический. Кислота сульфаниловая NH₂C₆H₄SO₃H·2H₂O и 1-нафтиламина гидрохлорид C₁₀H₇NH₂·HCl или 1-нафтиламин C₁₀H₇NH₂ или сульфаниламид NH₂C₆H₄SO₂NH₂ и N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорид (C₁₀H₇NHCH₂—CH₂NH₂·2HCl) чда. Гидроксид натрия хч. Вода дистиллированная. Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Раствор ацетата цинка готовят растворением 220 г Zn(CH₃COOH)₂·2H₂O в смеси воды и 30 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем раствора до 1 дм³. Раствор калия ферроцианида (II) K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O готовят растворением 172 г вещества и доведением объема раствора до 1 дм³.

Раствор сульфата цинка готовят растворением 535 г ZnSO₄·7H₂O в воде и доводят объем раствора до 1 дм³.

Раствор гидроксида натрия готовят растворением 30 г NaOH в воде и доводят объем раствора до 0,1 дм³.

Буферный раствор рН 9,6–9,7 готовят смешением 600 мл воды, 50 мл концентрированной соляной кислоты 135 мл аммиака водного, устанавливают рН раствора 9,6–9,7 и доводят объем раствора до 1 дм³.

Раствор сульфата кадмия готовят растворением 80 г 3CdSO₄·8H₂O в воде и доводят объем раствора до 1 дм³.

Раствор сульфата меди готовят растворением 20 г CuSO₄·5H₂O в воде и доводят объем раствора до 1 дм³.

Раствор трилона Б готовят растворением 33,5 г Na₂C₁₀H₁₄N₂O₈·2H₂O в воде и доводят объем раствора до 1 дм³.

Раствор для обработки кадмиевой колонки готовят смешением 50 мл раствора трилона Б и 20 мл 0,1 М раствора соляной кислоты в воде и доводят объем раствора до 1 дм³.

Стандартный раствор нитрата калия, содержащий 1 мг NO_3^- /мл готовят растворением 1,63 г KNO_3 , перекристаллизованного из воды и высушенного до постоянной массы при 120 °С, в воде и доводят объем раствора до 1 дм³. Срок хранения основного раствора 6 мес. при температуре 4 °С.

Рабочий стандартный раствор нитрата калия, содержащий 10 мкг NO_3^- /мл готовят разбавлением 10 мл основного стандартного (1 мг/мл) раствора KNO_3 смешением с 20 мл буферного раствора рН 9,6–9,7 и доводят объем раствора до 1 дм³. Срок хранения рабочего раствора 1 сутки.

Стандартный раствор нитрита натрия, содержащий 0,2 мг NO_2^- /мл готовят растворением 0,15 г NaNO_2 , перекристаллизованного из воды и высушенного до постоянной массы при 110 °С, в воде и доводят объем раствора до 1 дм³. Срок хранения основного раствора 7 суток при температуре 4 °С.

Рабочий стандартный раствор нитрита натрия, содержащий 2 мкг NO_2^- /мл готовят разбавлением 10 мл основного стандартного (1 мг/мл) раствора NaNO_2 смешением с 20 мл буферного раствора рН 9,6–9,7 и доводят объем раствора до 1 дм³. Срок хранения рабочего раствора 1 сутки.

Растворы для проведения цветной реакции.

Раствор 1 получают растворением 1 г сульфаниламида в 30 мл воды, добавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты и доводят объем раствора до 0,2 дм³. Раствор хранят в темной склянке в течение 2 недель при 4 °С.

Раствор 2 получают растворением 0,1 г N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорида в воде и доводят объем раствора до 50 см³. Раствор хранят в темной склянке в течение 2 недель при 4 °С.

Реактив Грисса готовят растворением 2,1 г сульфа-ниловой кислоты в 200 см³ горячей дистиллированной воды и после охлаждения добавляют 50 мл ледяной уксусной кислоты. 0,521 г 1-нафтиламина гидрохлорида растворяют в 50 мл ледяной уксусной кислоты доводят объем раствора водой до 0,2 дм³. Растворы хранят в темной склянке в течение 2 недель при 4 °С. Оба раствора смешивают в мерной колбе, фильтруют через фильтровальную бумагу и доводят объем раствора ледяной уксусной кислотой до 500 см³. Используют в течение 2 дней.

Растворы HCl 0,1 М, 2 М и 5,55 М готовят соответствующим разбавлением из фиксанала или концентрированной HCl .

Раствор нитрата серебра получают растворением 1 г AgNO_3 в воде и доводят объем раствора до 0,1 дм³.

ПОДГОТОВКА ПОРИСТОГО КАДМИЯ

250–300 шт гранул цинка заливают 1 л раствора сульфата кадмия. Через 24 ч выделившийся Cd отделяют от остатков непрореагировавшего Zn , промывают водой, водную суспензию гомогенизируют на гомогенизаторе до получения частиц со средним диаметром 0,3–0,8 мм, промывают декантацией 2–3 раза 0,1 М раствором HCl и водой, добавляют 200 мл раствора сульфата меди, осторожно перемешивают в течение 1 мин, раствор сульфата меди декантируют и промывают обмедненный Cd дистиллированной водой.

ПОДГОТОВКА КАДМИЕВОЙ КОЛОНКИ

В хроматографической колонке формируют без пузырей воздуха слой полученного Cd высотой 17 см.

Колонку промывают пропусканием со скоростью 6 мл/мин смеси, состоящей из 750 мл дистиллированной воды, 225 мл рабочего стандартного раствора нитрата калия, 20 мл буферного раствора рН 9,6–9,7 и 20 мл раствора трилона Б. Окончательно от нитритов колонку отмывают дистиллированной водой. Cd в колонке хранят под слоем воды.

Восстанавливающую способность колонки проверяют перед каждым анализом. Через колонку со скоростью 4 мл/мин пропускают смесь 20 мл рабочего стандартного раствора нитрата калия и 5 мл буферного раствора рН 9,6–9,7. Элюат собирают в мерную колбу вместимостью 0,1 дм³, колонку промывают дистиллированной водой порциями по 15 мл, которые собирают в эту же мерную колбу и доводят объем раствора до 0,1 дм³, получая стандартный элюат. Проводят контрольный опыт, пропуская через колонку со скоростью 4 мл/мин пропускают смесь 20 мл дистиллированной воды и 5 мл буферного раствора рН 9,6–9,7.

Элюат собирают в мерную колбу вместимостью 0,1 дм³, колонку промывают дистиллированной водой порциями по 15 мл, которые собирают в эту же мерную колбу и доводят объем раствора до 0,1 дм³, получая контрольный элюат. В две мерные колбы вместимостью 50 см³ вносят по 25 мл стандартного и контрольного элюатов и проводят определение нитритов. Если определяемое по градуировочному графику содержание нитритов в элюате менее 0,67 мкг/мл (90%) колонку следует регенерировать.

Регенерацию колонки проводят при снижении ее эффективности. Для этого ее промывают со скоростью 6 мл/мин 100 мл раствора для обработки кадмиевой колонки, 25 мл 0,1 М раствора HCl , 50

мл воды и 25 мл разбавленного 1:9 буфера pH 9,6–9,7. При недостаточности такой промывки Cd выдерживают в течение 24 ч в стакане в 2 М растворе HCl, отмывают водой до отсутствия в промывной воде остатков Cl-ионов (проба с AgNO₃), промывают раствором сульфата меди и проводят заполнение колонки, через которую пропускают со скоростью 6 мл/мин смесь, состоящую из 750 мл дистиллированной воды, 100 мл рабочего стандартного раствора нитрата калия, 20 мл буферного раствора pH 9,6–9,7 и 2 мл раствора трилона Б. Окончательно от нитритов колонку отмывают дистиллированной водой (300 мл) и проверяют восстанавливающую способность Cd.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ ТВЕРДЫХ ПРОДУКТОВ

10 г образца гомогенизируют с 100 мл воды, имеющей температуру 55 °С.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ ЖИДКИХ ПРОДУКТОВ

Молоко, жидкие молочные продукты в количестве 100 мл смешивают с 10 мл воды, имеющей температуру 55 °С.

20 г твердых молочных продуктов (сыр и др.) измельчают и гомогенизируют с 100 мл воды, имеющей температуру 55 °С.

10 г сухого молока смешивают с 100 мл воды, имеющей температуру 55 °С.

ПОСТРОЕНИЕ ГРАДУИРОВочНОГО ГРАФИКА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРИТОВ

В 5 мерных колб вместимостью 50 см³ вносят 0 (контроль); 2,5; 5; 10 и 25 мл стандартного рабочего раствора нитрита, что соответствует 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 мкг нитрита в 1 мл раствора.

Проведение цветной реакции с растворами N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорида и сульфаниламида.

В каждую из колб, содержащую 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 мкг NO₂-/мл раствора, добавляют воду до 30 мл, 5 мл раствора сульфаниламида и 1 мл 5,55 М раствора HCl, перемешивают при 20 °С в течение 1 мин, выдерживают еще 5 мин, добавляют по 1 мл раствора 2 N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорида, доводят до объема 50 см³, перемешивают, выдерживают в темноте в течение 10 мин и измеряют не позднее чем через 30 мин оптическую плотность растворов на спектрофотометре при λ = 538 нм против контроля, не содержащего нитритов (рис. 7.1).

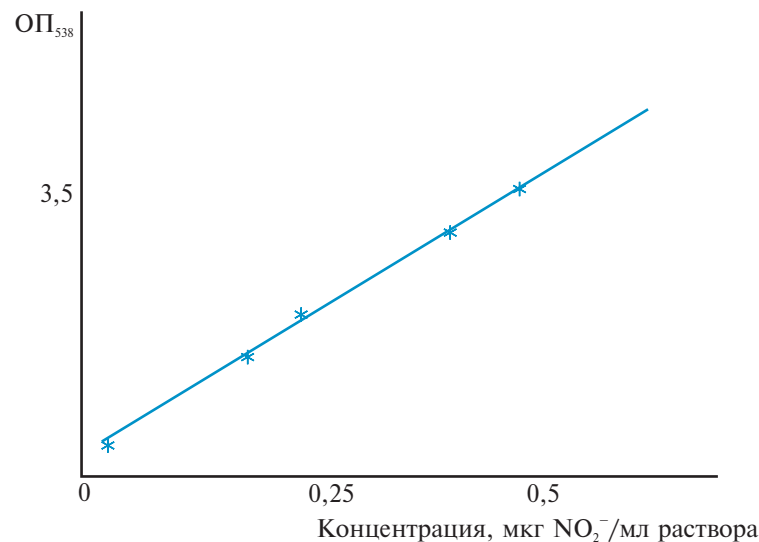


Рис. 7.1. Зависимость оптической плотности среды при 538 нм комплекса с N-(1-нафтил)этилендиамином дигидрохлоридом и сульфаниламидом от концентрации нитритов

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ С РЕАКТИВОМ ГРИССА

В каждую из колб, содержащую 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 мкг NO₂- в 1 мл раствора, добавляют по 10 мл реактива Грисса, доводят до объема 50 см³, перемешивают, выдерживают в темноте в течение 1 ч и измеряют не позднее чем через 30 мин оптическую плотность растворов на спектрофотометре при λ = 522 нм против контроля, не содержащего нитритов.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Водную суспензию подготовленного к анализу продукта смешивают при температуре 65 °С с 12 мл раствора сульфата цинка, 12 мл раствора K₄[Fe(CN)₆] и 40 мл буферного раствора pH 9,6–9,7 в течение 15 мин, охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 см³, доводят объем раствора до 200 см³, фильтруют через бумажный фильтр и получают фильтрат для определения нитратов и нитритов.

При получении мутного раствора экстрактивное осаждение белка повторяют, используя большее количество осадителей или добавляют дополнительно 2–5 мл раствора NaOH до pH 9.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИТОВ

В мерную колбу вместимостью 50 см³ вносят 20 см³ фильтрата и проводят цветную реакцию с растворами N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорида и сульфаниламида или реактива Грисса по схеме построения градуировочного графика.

Контролем служит раствор, в котором вместо фильтрата используют воду.

По значению оптической плотности с помощью градуировочного графика находят концентрацию нитритов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ

Перед анализом и после каждого анализа кадмиевую колонку промывают последовательно 25 мл 0,1 М раствора HCl, 50 мл дистиллированной воды и 25 мл разбавленного (1:9) буферного раствора pH 9,6–9,7.

20 мл фильтрата, полученного при проведении анализа и 5 мл буферного раствора pH 9,6–9,7 пропускают через подготовленную кадмиевую колонку со скоростью 3–4 мл/мин. Элюат собирают в мерную колбу вместимостью 0,1 дм³, колонку промывают дистиллированной водой порциями по 15 мл, которые собирают в эту же мерную колбу, доводя объем до 80 мл. К полученному элюату добавляют 10 мл раствора 1 сульфаниламида и 2 мл 5,55 М раствора соляной кислоты, перемешивают, выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 5 минут, добавляют 2 мл раствора 2 N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорида и доводят объем раствора до 0,1 дм³. Раствор перемешивают, оставляют в темноте при комнатной температуре в течение 10 минут.

Измеряют оптическую плотность раствора против контроля — пробы, полученной при пропускании дистиллированной воды через колонку.

РАСЧЕТ

Массовую концентрацию нитритов (X) в мг/дм³ жидкого продукта (мг/кг для твердого продукта) в расчете на нитрит ион вычисляют по формуле:

$$X = K \cdot C_1 \cdot V_1 \cdot V_2 / V_3 \cdot V_4,$$

где: K — коэффициент, равный 1,09 (молоко), 1,0 (сметана, творог), 1,1 (мясопродукты); C₁ — массовая концентрация нитритов, найденная по градуировочному графику, мкг/мл; V₁ — общий объем экстракта, мл; V₂ — объем колориметрического раствора, мл; V₃ — объем образца, взятый для анализа, мл (для твердого продукта берется m — масса образца, кг); V₄ — объем фильтрата, взятый в цветную реакцию, мл.

Массовую концентрацию нитратов (Y) в мг/кг, мкг/г (для твердого продукта) в расчете на нитрат ион вычисляют по формуле:

$$Y = K_2 \cdot [(C_2 \cdot V_1 \cdot V_6 \cdot V_8 / m \cdot V_5 \cdot V_7) - X],$$

где: K₂ — коэффициент, равный 1,43 (молоко, сливки, сыр), 1,26 (творог), 1,4 (мясопродукты); C₂ — массовая концентрация нитритов, найденная по градуировочному графику, мкг/мл; V₁ — общий объем экстракта, мл; V₅ — объем фильтрата, взятый на восстановление на колонку, мл; V₆ — общий объем элюата, мл; V₇ — объем элюата, взятый на цветную реакцию, мл; V₈ — общий объем колориметрического раствора, мл; m — масса образца продукта, взятого на анализ, г (при расчете содержания нитратов в мг/л, мг/дм³ вместо m подставляют значение V — объема пробы на анализ).

Вычисления проводят до первого десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать значений воспроизводимости внутрилабораторной (r) и межлабораторной (R) по отношению к среднему арифметическому при p = 0,95.

Воспроизводимость определения нитратов для концентраций (мг/кг или мг/л) 5, 10, 25, 50 и 100 равна, соответственно: 2,7 (r) — 4,3 (R); 3,3 (r) — 6,7 (R); 5,0 (r) — 13,9 (R); 7,9 (r) — 25,9 (R); 13,6 (r) — 49,9 (R).

Воспроизводимость определения нитритов для концентраций (мг/кг или мг/л) 1, 5, 10, 15 равна, соответственно: 0,3 (r) — 1,2 (R); 0,7 (r) — 5,3 (R); 1,2 (r) — 10,4 (R); 1,7 (r) — 15,5 (R).

Нижний предел обнаружения нитритов равен 0,02 мг NO₂— в 1 см³ колориметрического раствора, что соответствует 0,1 мг/кг для жидких и твердых продуктов и 1 мг/кг для сухих продуктов.

Нижний предел обнаружения нитратов равен 0,03 мг NO₃— в 1 см³ колориметрического раствора, что соответствует 0,2 мг/кг для жидких и твердых продуктов и 2 мг/кг для сухих продуктов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ МЕТОДОМ ИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Метод основан на экстракции нитратов и нитритов водой, очистке экстракта или прямом определении концентрации нитратов и нитритов в растворе пробы с использованием кондуктометрического датчика.

ОБОРУДОВАНИЕ

Портативный ионный хроматограф IC-2001 фирмы Eppendorf-Biotronic (ФРГ) с кондуктометрическим детектором и колонками (раз-

делительной ВТ X AN-S и подавляющей ВТ S AG-P) для определения анионов (F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}), присоединенный к компьютеру с автоматической программой обсчета хроматографических данных типа Winpeak фирмы Eppendorf-Biotronic (ФРГ). Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности и пределом допустимой погрешности 0,2 мг. Автоматические пипетки 1–2–5–10–25 см³. Микрошприц для жидкостной хроматографии на 100 мкл. Бумага фильтровальная лабораторная. Мембранный фильтр 0,45 мкм. Картридж С18. Микрогомогенизатор для измельчения твердых образцов.

РЕАКТИВЫ

Вода бидистиллированная или квалификации для ВЭЖХ. Готовые растворы: 3,5 мМ Na_2CO_3 / 0,5 мМ $NaHCO_3$, ГСО стандартных растворов нитратов и нитритов или готовые стандартные растворы, содержащие 10 ppm (мг/л) NO_2^- и NO_3^- -ионов. 0,5 М раствор HCl или готовый регенерирующий раствор.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Водные растворы подвергают фильтрации через мембранный фильтр 0,45 мкм.

Все растворы, вводимые в жидкостную линию хроматографа, включая элюент, подвергают мембранной фильтрации через фильтр 0,45 мкм.

Твердые образцы подвергают гомогенизации в воде (1:100) с последующей фильтрацией раствора через бумагу, картридж С18 для удаления избытка органических кислот и мембранный фильтр 0,45 мкм. В случае высокого содержания ионов тяжелых металлов 50 мл пробы обрабатывают 2 г катионита типа D-50 в H^+ -форме для их сорбции.

Ионный хроматограф включают и подготавливают к работе в соответствии с технической документацией на хроматограф, устанавливая диапазон измерений по чувствительности — 1, расход элюента 2,4 мл/мин и записывают в течение 30 мин базовую линию, используя компьютерную программу обработки данных.

Колонки хроматографа промывают в течение 10 мин элюентом. По окончании работы, в случае длительного хранения, колонки промывают бидистиллированной водой и заполняют метанолом.

При исчерпании ресурса подавляющей колонки ее отсоединяют от аналитической колонки и промывают в течение 10 мин 0,5 М раствором HCl или готовым регенерирующим раствором, бидистил-

лированной водой и элюентом. Для консервации хроматографа жидкостная система промывается водой и заполняется метанолом, а перед началом работы промывается 30 мин водой и элюентом до получения удовлетворительной базовой линии.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Микрошприцем в подготовленный в соответствии с инструкцией по эксплуатации хроматограф при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью элюент в отверстие клапана, закалывают 100 мкл стандартного раствора, содержащего 10 ppm (мг/л) NO_2^- и NO_3^- -ионов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию. Автоматически записывают стандартную хроматограмму, по которой определяют и вводят в компьютерную программу пересчетные коэффициенты.

Хроматограф с установленной скоростью потока промывают элюентом до выравнивания базовой линии (базовая линия на мониторе должна иметь вид горизонтальной прямой) в течение 10–15 мин и микрошприцем при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью элюент, в отверстие клапана закалывают 100 мкл анализируемого раствора пробы с неизвестным содержанием нитратов и нитритов. Микрошприц из клапана не вынимают во избежание попадания воздуха в жидкостную линию.

Автоматически записывают хроматограмму, которая в соответствии с общепринятыми нормами оценки результатов хроматографических данных должна содержать два отдельно стоящих пика (соответствующих NO_2^- и NO_3^-), высота которых не должна превышать достоверно анализируемую высоту в мВ («обрезанные пики») и расстояние между которыми не должно быть меньше половины полуширины основания одного из пиков. При нарушении этих условий повторяют «закол» неизвестной пробы, разбавляя ее в 10 раз. В результате анализа раствора с неизвестной концентрацией на хроматограмме должны идентифицироваться четкие пики с высотой не менее 10 мВ (<10 мВ очень сильно разбавленный раствор пробы) и не более 200 мВ (>200 мВ очень концентрированные по определяемым ионам растворы).

При получении удовлетворительных результатов и в соответствии с введенной калибровкой автоматически получают результат содержания NO_2^- и NO_3^- -ионов в анализируемой пробе в мг/л.

Микрошприцем в подготовленный хроматограф (базовая линия на мониторе должна иметь вид горизонтальной прямой) при работающем автоматическом насосе, качающем с заданной скоростью элю-

ент, в отверстие клапана закалывают 100 мкл пробы и автоматически записывают хроматограмму, по которой автоматически определяют концентрацию.

РАСЧЕТ

Определение концентрации в анализируемом растворе осуществляется автоматически по соответствующим временам удержания пиков NO_2^- и NO_3^- -ионов и их площадям, протокол распечатывается.

Вычисления автоматически проводятся до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания нитритов и нитратов в любой пробе при допускаемых методикой изменения влияющих факторов $\pm 0,15 X$.

Минимальная определяемая концентрация — 1 ppm (мг/л).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ N-НИТРОЗАМИНОВ

Метод основан на выделении летучих нитрозаминов из продукта перегонкой с паром или в вакууме, экстракции метиленхлоридом, денитрозировании выделенных нитрозаминов HNg в уксусной кислоте, алкилировании образовавшихся аминов 8-метокси-5-хинолинсульфониллазиридином, разделении и определении флуоресцирующих 8-метокси-5-[N-(2-N-диэтил-ламино)]хинолинсульфонамидных производных в тонком слое силикагеля.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности 0,2 мг. Термостат или сушильный шкаф на 20–250 °С. Испаритель ротационный типа Buchi (Швейцария) или другого аналогичного класса. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Пипетки 1–2–5–10–25 см³. Бумага фильтровальная лабораторная. Флуориметр для измерения флуоресценции. Микрогомогенизатор для измельчения образцов. рН-метр. Пластинки хроматогра-

фические ТСХ «Силуфол» производства Чехии или «Сорбфил» или «Метск» (ФРГ). Камера для хроматографирования: сосуд с плоским дном, закрывающийся шлифованной крышечкой, стеклянный. Микрошприц МШ10 или аналогичный для нанесения 1–10 мкл пробы на пластинку ТСХ. Устройство для нагревания перегонной колбы.

Дефлегматор елочный, шлиф 14,5–29. Холодильник Либиха с аллонжем шлиф 14,5. Насадка Вюрца, шлиф 14,5. Холодильник обратный, шлиф 29. Насадка-барбатер. Колбы круглодонные вместимостью 5–1000 мл, шлиф 29. Колбы плоскодонные вместимостью 50–250 мл. Делительные воронки вместимостью 5 и 250 мл. Цилиндры мерные на 50–500 мл. Колбы мерные или пробирки вместимостью 2–100 мл. Эксикатор. Воронки химические. Палочки и трубки стеклянные. Баллон с инертным газом. Сосуд Дьюара с сухим льдом или жидким азотом.

РЕАКТИВЫ

Аммиак водный хч. Ацетонитрил для хроматографии. Этилацетат хч. Бензол осч. Вода дистиллированная. n-Гексан чда. Кальция хлорид, прокаленный. Кислота бромистоводородная. Кислота соляная концентрированная, 0,1 М раствор, хч. Кислота серная концентрированная, 1 н. и 5 н. раствор, хч. Кислота уксусная ледяная. Метилен хлорид чда. Натрия гидроксид хч и 0,1 М раствор. Сульфат натрия хч, прокаленный. Натрия гидрокарбонат чда, 1% раствор. Натрия хлорид хч. Метанол для хроматографии. Спирт этиловый ректификованный. Сульфаниловая кислота чда, 2% раствор. 8-метокси-5-хинолинсульфониллазиридин чда, раствор 1 мг в 5 мл. 8-метокси-5-[N-(2-N-диэтиламино)]хинолинсульфонамидные производные с диметиламином, диэтиламино, дипропиламином, спиртовые растворы 2 мг/мл. 3% раствор газообразного HNg в ледяной уксусной кислоте. Нитрозодипропиламин, гексановый раствор 0,2 мг/100 мл. Апиэзон, насыщенный раствор в этаноле. Вазелиновое масло.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Нитрозамины являются канцерогенными веществами. Все работы с ними проводятся под тягой с соблюдением правил безопасной работы с вредными и опасными химическими веществами. Нейтрализацию нитрозаминов проводят 3%-ным раствором газообразного HNg в ледяной уксусной кислоте. Для разрушения летучих нитрозаминов в воздухе после окончания работы помещения обрабатывают ультрафиолетовым светом.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Ампулу с 8-метокси-5-хинолинсульфониллазиридином, раствор 1 мг в 5 мл переносят количественно в мерную колбу и доводят объем раствора до 50 см³ добавлением этанола. Получают раствор флуоресценции 0,02 мг/мл.

Стандартный раствор нитрозодипропиламина с концентрацией 2 мкг/мл используют в качестве внутреннего стандарта. Срок хранения при 4 °С в темной посуде 1 год.

Стандартные растворы 8-метокси-5-[N-(2-N-диэтиламино)]хинолинсульфон-амидные производные с диметиламином, диэтиламином, дипропиламином разбавляют, количественно перенося 2,5 мл раствора ($C_1 = 5\text{мг}/5\text{мл}$) из ампул в мерную колбу на 25 мл, и доводят объем стандартного раствора до 25 мл этанолом и получают раствор $C_2 = 0,1\text{ мг}/\text{мл}$.

2,5 мл и 1,25 мл стандартного раствора C_2 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объемы растворов до 25 мл, получая концентрации стандартных растворов 8-метокси-5-[N-(2-N-диэтиламино)]хинолинсульфонамидных производных с диметиламином, диэтиламином, дипропиламином соответственно $C_3 = 10\text{ нг}/\text{мкл}$ и $C_4 = 5\text{ нг}/\text{мкл}$. Срок хранения растворов при 4 °С в темной посуде 1 год.

Очистка метиленхлорида. Используемый метиленхлорид упаривают в 75 раз до объема 1 мл, в котором проводят определение нитрозаминов. В случае обнаружения их следовых количеств в растворителе, 500 мл метиленхлорида промывают 2 раза по 30 мл концентрированной серной кислотой и дистиллированной водой, 30% раствором гидроксида натрия и водой до нейтрального значения pH, высушивают прокаленным хлоридом кальция и проводят фракционную перегонку, собирая фракцию с температурой кипения $40,0 \pm 0,2\text{ °С}$.

Все используемые реактивы проверяют на следовые количества нитрозаминов. Для этого пробу реактивов из каждой партии подвергают экстракции очищенным метиленхлоридом и в экстракте проводят контрольное определение нитрозаминов. При положительном результате проводят дополнительную очистку данного реактива перекристаллизацией.

ПОДГОТОВКА ПЛАСТИН ДЛЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Пластины для ТСХ типа «Силуфол» перед употреблением промывают. Для этого в хроматографическую камеру наливают систему растворителей бензол-этилацетат-уксусная кислота (100:50:1) или ацетон-аммиак (1:1) на высоту 5–7 мм и помещают туда пластинки

в вертикальном положении. После того, как линия фронта растворителя поднимется, не доходя 10 мм до верха пластинки, ее вынимают, высушивают на воздухе, затем активируют в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 60 мин. Перед употреблением с вертикальных сторон пластинки удаляют слой в 3 мм, что способствует выравниванию фронта растворителя. Пластинки сохраняют в эксикаторе над прокаленным хлоридом кальция.

ВЫДЕЛЕНИЕ НИТРОЗАМИНОВ ПЕРЕГОНКОЙ С ПАРОМ

Навеску 50–100 г измельченного в гомогенизаторе продукта помещают в круглодонную колбу с барбатором вместимостью 500 мл, добавляют 10 г NaCl, 10 г Na₂SO₄, 50 мл дистиллированной воды, 5 мл 2% раствора сульфаниловой кислоты, 5–10 мл 1 н. раствора серной кислоты до pH < 3, 1 мл стандартного гексанового раствора нитрозодипропиламина (0,2 мг/100 мл). Проводят отгонку с водяным паром, пропускавая водяной пар из насадки Вюрца перегонной системы для дистилляции через приготовленную суспензию анализируемого образца. Собирают 200–300 мл дистиллята. Для предотвращения вспенивания массы в колбу добавляют 5 мл насыщенного раствора апиэзона в этаноле. Для предотвращения спекания массы в колбу добавляют стеклянные трубки. Дистиллят подвергают 5-кратному экстрагированию по 15 мл очищенного метиленхлорида. Объединенные экстракты высушивают над прокаленным сульфатом натрия и отгоняют метиленхлорид до объема 2 мл в колбе в токе инертного газа при температуре 55–65 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ НИТРОЗАМИНОВ ПЕРЕГОНКОЙ В ВАКУУМЕ

Навеску образца 20–50 г помещают в колбу вместимостью 200 мл, добавляют 80 мл дистиллированной воды, 1 мл стандартного гексанового раствора N-нитрозодипропиламина (0,2 мг/100 мл), 4 мл 0,1 М раствора NaOH, 20 мл вазелинового масла. Колбу герметично соединяют отводной трубкой с приемником в системе отгонки летучих веществ. Приемник помещают в сосуд Дьюара с сухим льдом или жидким азотом. Вакуум отгонку нитрозаминов проводят, нагревая колбу с пробой при температуре 100 °С в течение 1 ч при вакууме 40 мБар, получая 50 мл дистиллята. После оттаивания колбы-приемника с дистиллятом в ней промывают отгонную трубку несколькими миллилитрами дистиллированной воды, в приемник добавляют 2 мл этанола, 0,5 мл 5 н. серной кислоты и экстрагируют трижды по 10 мл хлористого метилена. Экстракты объединяют, осушают над слоем прокаленного сульфата натрия и упаривают метиленхлорид до остаточного объема 2 мл, пропуская в колбу поток инертного газа, при температуре 40 °С.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1 мл раствора, полученного в результате выделения нитрозаминов, смешивают с 1 мл 3%-ного раствора газообразного HBr в уксусной кислоте, выдерживают смесь в течение 30 мин при комнатной температуре и упаривают досуха на роторном испарителе при 40–50 °С и давлении 1–2 кПа. К сухому остатку добавляют 0,2–0,3 мл 1%-ного раствора натрия гидрокарбоната до $\text{pH} > 8$, добавляют 0,5 мл 0,02 мг/мл спиртового раствора флуоресцента 8-метокси-5-хинолинсульфонилазиридина, кипятят 30 мин с обратным холодильником при температуре 100 °С, упаривают смесь досуха, остаток растворяют в 0,3 мл этанола и получают раствор, который используют для анализа нитрозаминов. Полученные 8-метокси-5-[N-(2-N-диэтиламино)]хинолинсульфониламидные производные аминов, содержание которых эквивалентно содержанию нитрозаминов анализируют методом ТСХ в сравнении со стандартом.

Для получения холостой пробы реакция денитрозирования с HBr не проводится. Ко второй части раствора, полученного в результате выделения нитрозаминов в количестве 1 мл, добавляют 0,1 мл 0,02 мг/мл спиртового раствора флуоресцента 8-метокси-5-хинолинсульфонилазиридина, кипятят 30 мин с обратным холодильником при температуре 100 °С, упаривают смесь досуха, остаток растворяют в 0,3 мл этанола и получают раствор, который анализируют методом ТСХ.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРОЗАМИНОВ

На подготовленную хроматографическую пластинку на расстоянии 3 см от нижнего края с интервалом в 2 см наносят прикосновением к поверхности пластинки микрошприца по 20 мкл обработанной в ходе проведения анализа испытуемой пробы и холостой пробы в этаноле, по 1 мкл стандартных растворов 8-метокси-5-[N-(2-N-диэтиламино)]хинолинсульфониламидных производных с диметиламином, диэтиламином, дипропиламином с концентрациями $C_1 = 1$ мг/мл, $C_2 = 0,1$ мг/мл, $C_3 = 10$ нг/мкл и $C_4 = 5$ нг/мкл.

Пластинку переворачивают на 180 °С и помещают в хроматографическую систему бензол-этилацетат-уксусная кислота (100:50:1). Хроматографирование проводят до достижения фронтом растворителя верхнего края пластинки. 2 см от верхнего края пластинки с липофильными примесями отрезают.

Пластинку переворачивают на 180 °С и вновь помещают в хроматографическую камеру со смесью ацетонитрил — 25%-ный аммиак (9:1). Уровень смеси должен быть на 1 см ниже нанесенных пятен. Разви-

тие хроматограммы проводят до достижения растворителем верхнего края пластинки. Пластинку подсушивают на воздухе, вновь помещают в систему бензол-этилацетат-уксусная кислота (100:50:1), хроматографируют в том же направлении, сушат и рассматривают в УФ свете. R_f пятен комплексов 8-метокси-5-[N-(2-N-диэтиламино)]хинолинсульфониламидных производных с диэтиламином, диметиламином, дипропиламином равны соответственно 0,2; 0,25; 0,6.

Сравнивают интенсивность флуоресценции различных количеств стандартов нитрозаминов и испытуемой пробы. Сравнение интенсивности флуоресценции комплекса нитрозодипропиламина по сравнению с внесенным внутренним стандартом нитрозодипропиламина $R_f = 0,6$ позволяет определить степень извлечения нитрозамина из образца — s . По интенсивности флуоресценции испытуемого образца и холостой пробы определяют нитрозамины (НА, мкг/кг):

$$\text{НА} = 2,4 \cdot N \cdot V_2 \cdot 100 / g \cdot V_1 \cdot s,$$

где: N — количество нитрозаминов в пятне с учетом холостого опыта, мкг; g — количество (навеска) продукта, кг; V_1 — объем нанесенной пробы, мкл; V_2 — объем анализируемой пробы, мкл; 2,4 — поправочный коэффициент; s — степень извлечения нитрозаминов из образца.

Вычисления производят до первого десятичного знака. Окончательный результат округляют до целого числа.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 30% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,9$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРОЗАМИНОВ НА ФЛУОРИМЕТРЕ

Количественно содержание нитрозаминов проводят на флуориметре. Для этого на пластинки на расстоянии 3 см от нижнего края наносят полосой в 7 см всю пробу, полученную при проведении экстракта (300 мкл) и аналогично пробе стандартов.

Проводят последовательное хроматографирование так, как это описано для идентификации и определения нитрозаминов. Флуоресцирующие зоны, соответствующие искомому нитрозаминам (положение определяют по стандартам), очерчивают карандашом, вырезают и элюируют в течение 30 мин перемешиванием с 4 мл 1 М раствора HCl при 20 °С. Аналогично поступают, элюируя в этих же условиях пятна стандартов.

Измеряют флуоресценцию полученных растворов на спектрофлуориметре при длине возбуждения 340 нм и длине волны флуоресценции 480 нм.

Содержание нитрозаминов в пробе (НА, мкг/кг) вычисляют по формуле:

$$НА = 2,4 \cdot N \cdot \Phi_1 \cdot 100 / g \cdot \Phi_2 \cdot s,$$

где: N — количество нитроаминов стандарта, мкг; g — количество (навеска) продукта, кг; Φ_1 — флуоресценция нитроаминов образца за вычетом флуоресценции холостого опыта; Φ_2 — флуоресценция соответствующего нитроаминового стандарта; 2,4 — поправочный коэффициент; s — степень извлечения нитроаминов из образца.

Вычисления производят до второго десятичного знака. Окончательный результат округляют до первого десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому при вероятности $p = 0,9$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИОГЕННОГО АМИНА (ГИСТАМИНА) В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

Колориметрический метод определения содержания гистамина основан на измерении величины абсорбции образуемого комплекса гистамина с диазореактивом.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности. Воронки В-35–50 ХС, В-100–150 ХС. Воронки делительные ВД-3–250–29/32 ХС. Колбы конические Кн-10–100–29/32 ТС. Колбы мерные 1–100–2; Спектрофотометр или фотометр на 490 нм. Микроразмельчитель тканей типа РТ-2. Пипетки автоматические на 50–1000 мкл. Пробирки мерные с притертыми пробками вместимостью 10–15 см³. Термометр 0–100 °С. Термостат на 20–250 °С.

РЕАКТИВЫ

Кислота соляная хч, 0,1 М раствор. Кислота трихлоруксусная чда, 5% раствор. Натрия нитрит хч, 5% раствор. Натрия гидроксид чда, 5 М раствор. Натрий сульфат безводный, ч. Натрия карбонат, хч и 4% раствор. н-Бутанол. Вода дистиллированная. Стандартный образец гистамина гидрохлорида с содержанием основного вещества не менее 95%. Этилацетат хч, перегнанный. п-Нитроанилин, чда.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

п-Нитроанилин перекристаллизовывают из горячей воды и высушивают при 80 °С осадок вещества, полученного из охлажденного раствора, в течение 15 мин. 0,1 г п-нитроанилина растворяют в мерной колбе в 100 см³ 0,1 М раствора НСl. Срок хранения раствора при 4 °С — 6 мес.

Диазореактив получают непосредственно перед использованием путем смешения 10 мл раствора 1 г/л п-нитроанилина в 0,1 М растворе НСl с 1 мл 5% раствора NaNO₂ при 0 °С.

н-Бутанол, насыщенный водой, получают встряхиванием 50 мл н-бутанола и 20 мл воды в делительной воронке в течение 10 мин. После разделения фаз бутанольный слой отделяют.

Основной раствор гистамина с концентрацией 40 мкг/мл готовят растворением 4 мг гистамина гидрохлорида в мерной колбе вместимостью 100 см³ в 90 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты и доводят объем раствора до метки. Срок хранения раствора при 4 °С 1 неделя.

Рабочие растворы гистамина с концентрациями 5, 10, 20 мкг/мл получают разбавлением основного раствора гистамина с концентрацией 40 мкг/мл в 8, 4 и 2 раза соответственно путем добавления 5% раствора трихлоруксусной кислоты. Рабочие растворы используют сразу после приготовления.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Навеску измельченного образца в количестве 10 г перемешивают в микроизмельчителе в течение 5 мин с 25 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты. Полученную суспензию количественно переносят в коническую колбу, выдерживают при температуре 60 °С в течение 15 мин, охлажденную смесь переносят количественно в цилиндр, доводят объем раствора до 50 см³ и фильтруют смесь через бумажный фильтр.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

В пробирки с притертыми пробками помещают по 5 мл рабочих растворов гистамина с концентрациями 5, 10, 20 мкг/мл, добавляют 1 мл 5 М раствора натрия гидроксида, вносят при перемешивании в раствор 120–150 мг безводного карбоната натрия до получения насыщенного раствора, прибавляют 5 мл н-бутанола насыщенного водой, энергично встряхивают смесь в течение 1 мин.

После разделения фаз отбирают пипеткой 3 мл верхнего бутанольного слоя и переносят в другую пробирку с притертой пробкой, содержащую 3 мл 0,1 М раствора НСl, встряхивают содержимое 1 мин,

после разделения фаз отбирают пипеткой 2 мл нижнего водного слоя, переносят в другую пробирку, добавляют 2 мл 4% раствора Na_2CO_3 и выдерживают в течение 5 мин при 0°C .

К охлажденному до 0°C раствору приливают 2 мл холодного свежеприготовленного диазореактива, встряхивают, выдерживают смесь в течение 5 мин при 0°C , добавляют 4 мл этилацетата и энергично встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз отбирают сухой пипеткой верхний органический слой, переносят в другую пробирку, содержащую безводный Na_2SO_4 , и получают прозрачный окрашенный раствор диазокомплекса в этилацетате.

Измеряют величину оптической плотности (абсорбции) раствора при 495 нм и толщине слоя 1 см. По полученным данным строят калибровочную кривую зависимости величины абсорбции от концентрации рабочих растворов, содержащих гистамин в известной концентрации (рис. 7.2).

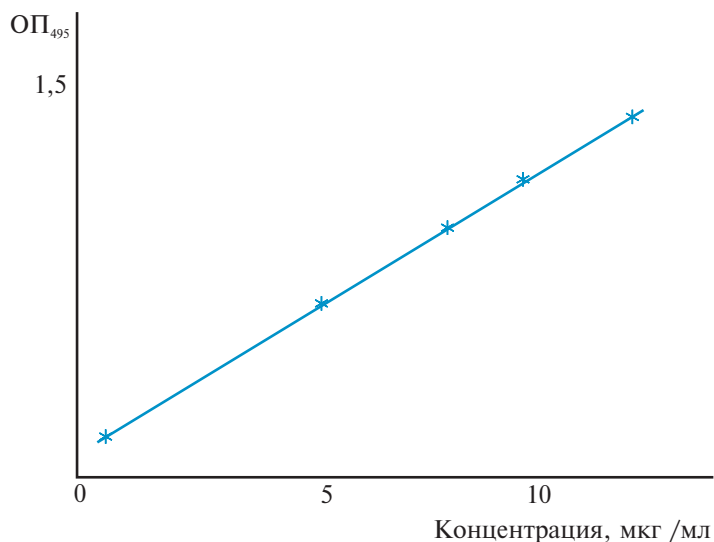


Рис. 7.2. Зависимость оптической плотности среды при 495 нм диазокомплекса с гистамином в этилацетате от концентрации гистамина

ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

В пробирку с притертой пробкой помещают 5 мл профильтрованного экстракта, полученного при проведении анализа, добавляют 1 мл

5М раствора натрия гидроксида, вносят при перемешивании в раствор 120–150 мг безводного карбоната натрия до получения насыщенного раствора, прибавляют 5 мл н-бутанола насыщенного водой, энергично встряхивают смесь в течение 1 мин.

После разделения фаз отбирают пипеткой 3 мл верхнего бутанольного слоя и переносят в другую пробирку с притертой пробкой, содержащую 3 мл 0,1 М раствора HCl , встряхивают содержимое 1 мин, после разделения фаз отбирают пипеткой 2 мл нижнего водного слоя, переносят в другую пробирку, добавляют 2 мл 4% раствора Na_2CO_3 и выдерживают в течение 5 мин при 0°C .

К охлажденному до 0°C раствору приливают 2 мл холодного свежеприготовленного диазореактива, встряхивают, выдерживают смесь в течение 5 мин при 0°C , добавляют 4 мл этилацетата и энергично встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз отбирают сухой пипеткой верхний органический слой, переносят в другую пробирку, содержащую безводный Na_2SO_4 и получают прозрачный окрашенный раствор диазокомплекса в этилацетате.

Измеряют величину оптической плотности (абсорбции) раствора при 495 нм и толщине слоя 1 см. По величине полученного значения оптической плотности (абсорбции) по градуировочной кривой (рис 7.5) определяют содержание гистамина в испытуемом растворе.

РАСЧЕТ

Содержание гистамина (X , мг/кг) вычисляют:

$$X = C \cdot V \cdot P / g,$$

где: C — концентрация гистамина, найденная по калибровочной кривой, мкг/мл; V — объем экстракта, мл (50 мл); g — навеска образца, взятая для анализа, г (10 г); P — коэффициент разбавления ($V_{\text{фильтрата}} + V_{\text{р-ра трихлоруксусной кислоты}} / V_{\text{фильтрата}}$, мл/мл).

Вычисления производят до первого десятичного знака. Окончательный результат округляют до целых единиц.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) трех параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 50% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,9$.

Минимально обнаруживаемое содержание гистамина 10 мг/кг.

Значение среднего квадратичного отклонения случайной составляющей погрешности измерений содержания гистамина одной и той же пробы при допусках методом изменений влияющих факторов в интервале концентраций 20–175 мг/кг варьируется от 0,08X до 0,25X.

При измерении содержания гистамина степень извлечения добавляемого к образцу стандарта гистамина составляет 90–98%.

7.5. АНАЛИЗ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ

Пестициды относятся к ядохимикатам. Вследствие интенсификации сельскохозяйственного производства за счет применения достаточно опасных химических веществ для ускорения роста растений, а также уничтожения вредителей урожая существует реальная опасность загрязнения продуктов питания остатками пестицидов. Потребление загрязненной пестицидами продукции оказывает неблагоприятное воздействие на здоровье человека.

По назначению пестициды разделяют на несколько групп, в том числе: инсектициды — вещества для уничтожения насекомых, гербициды — для уничтожения сорняков, фунгициды — для уничтожения грибковых заболеваний растений, родентициды — для уничтожения грызунов, нематоциды — для уничтожения почвенных паразитов, акарициды — для борьбы с клещами и т.д.

Нахождение пестицидов в природе сопровождается их разложением. По стойкости пестициды подразделяют на очень стойкие вещества, время разложения которых на нетоксичные компоненты составляет более 2 лет, стойкие, разлагающиеся в течение 0,5–1 года, умеренно стойкие (от 1 до 6 мес) и малостойкие, которые разлагаются в течение 1 месяца. Распад пестицидов в разнообразных объектах протекает различными путями. Чаще всего это происходит через ряд промежуточных соединений, которые, в свою очередь, представляют опасность, например ДДТ трансформируется в ДДД и ДДЭ. Нетрансформировавшиеся остатки пестицидов в пищевой продукции являются опасными для человека.

Пестициды могут относиться к группе сильнодействующих ядовитых веществ ($LD_{50} < 50$ мг/кг). Выделяют также высокотоксичные ($LD_{50} 50–200$ мг/кг) и среднетоксичные ($LD_{50} 200–1000$ мг/кг) вещества. Пестициды с $LD_{50} > 1000$ мг/кг классифицируют как малотоксичные.

С химической точки зрения выделяют основные классы пестицидов: хлорорганические соединения, фосфорорганические соединения, производные карбаматов, производные хлорфеноксикислот. В качестве пестицидов применяют и другие вещества — производные гидрохинона, замещенные триазины, азолы, производные бензойной кислоты, пиретрины и др.

Разнообразие химической природы пестицидов делает невозможным применение одной универсальной методики количественного определения остатков пестицидов в пищевых объектах, однако в большинстве случаев в основу количественного определения положен принцип экстрагирования пестицидов органическими растворителями с последующим получением очищенного раствора и определением содержания пестицида в таком растворе, как правило, хроматографическим методом.

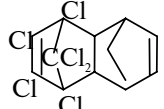

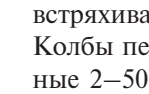
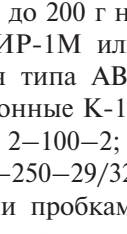
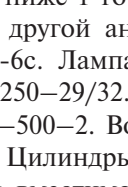
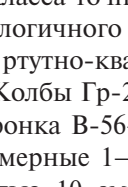
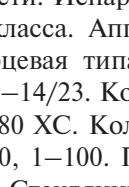
Для пестицидов в зависимости от объекта и типа самого пестицида величины ПДК составляют от 0,1 до 0,001 мг/кг. Так, для мясных продуктов остаточное содержание пестицидов устанавливалось на следующем уровне: абат — 1,0, актеллик — 0,01 (мясо), альдрин — не доп. (печень птицы), амидофос — 0,3 (мясо), атразин — 0,02, афуган — не доп., аэроль-2 — не доп. (контроль по ДДВФ и хлорофосу), базузин — не доп. (мясо птицы), базузин — 0,7, байтекс — 0,2 (мясо, мясные продукты), гексахлоран — 0,1, гексахлоран — 0,01 (мясо морских животных), гептахлор — не доп., гиподермин-хлорофос — не доп. (по хлорофосу), глак-Ц — 0,1 (по циодрину), ГХЦГ γ -изомер — 0,1, ГХЦГ — 0,01 (мясо морских животных), 2,4-Д аминная соль — не доп., 2,4-Д бутиловый эфир — не доп., 2,4-Д дихлорфеноксисукусная кислота — не доп., 2,4-Д дихлорфенол — не доп., 2,4-Д пропиловый эфир — не доп., 2,4-Д малолетучие эфиры — не доп., 2,4-ДМ — не доп., 2,4-Д октиловый эфир — не доп., 2,4-Д хлороктиловый эфир — не доп., ДДБТ — не доп., ДДТ и его метаболиты — 0,1, 0,2 мясо мор. жив. (тюлень), 0,03 (мясо мор. животных), валексон — 0,02 (по циодрину), дермаптозоль — не доп., дибром — 0,3, диурон — не доп., ДНОК — не доп., дуробан — 0,1, карбофос — не доп., камбилен — не доп., корал — 0,1 (мясо говядины, птицы), 0,2 (свинина), кремнефтористый натрий — 0,4, линдрон — не доп., лонтрел — 0,3, метилмеркаптофос — не доп., метафос — не доп., неопинамин — не доп., дихлоральмочевина — не доп., нитрафен — не доп., оксамат — не доп., пентахлорфенолят натрия — не доп., полихлоркампфен — не доп., полихлорпинен — не доп., пропоксур — не доп., реглон — 0,01, севин — не доп., сероцин — не доп., тиофос — не доп., тирам — не доп., трихлорметафос — 0,3, фозалон — не доп., хлорофос — не доп., полихлор — не доп., циодрин — 0,05, цирам — не доп., этафос — 0,01, фенагон — не доп.

В действующих в настоящее время нормативах регламентируется остаточное содержание трех хлорорганических пестицидов — ГХЦГ и его метаболитов, ДДТ и его метаболитов, а также 2,4-Д. Анализ наличия остатков других пестицидов проводится в специально оговариваемых случаях.

Определение остаточных количеств хлорорганических пестицидов: ДДТ — п, п-дихлордифенилтрихлорэтана и его метаболитов: ДДД — п, п-дихлордифенилдихлорэтана и ДДЭ — п, п-дихлордифенилдихлорэтилена; ГХЦГ и его изомеров: линдана — гамма-изомера гексахлорциклогексана, альфа-изомера гексахлорциклогексана, бета-изомера гексахлорциклогексана, гептахлора, кельтана и альдрина проводят с помощью тонкослойной и газожидкостной хроматографии.

ХЛОРООРГАНИЧЕСКИЕ ПЕСТИЦИДЫ

К хлорорганическим пестицидам относят вещества, содержащие атом хлора.

АЛЬДРИН (Aldrin)	
ГЕПТАХЛОП (Heptachlor)	
ГХЦГ (гексахлорциклогексан), γ-изомер ГХЦГ (γ-HCH, lindan)	
2,4-Д (дихлорфеноксиуксусная кислота, 2,4-D)	
ДДТ p, p-DDT	
ДДД p, p-DDD	
ДДЭ p, p-DDE	

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРОСОДЕРЖАЩИХ ПЕСТИЦИДОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Метод основан на экстракции пестицидов органическим растворителем из продукта, очистке экстракта, упаривании его досуха и хроматографировании в тонком слое. Метод предназначен для анализа содержания остаточных количеств пестицидов ДДТ и его метаболитов, гамма-ГХЦГ, кельтана, альдрина, гептахлора.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с. Лампа ртутно-кварцевая типа ПРК-4. Колбы перегонные К-1-250-29/32. Колбы Гр-25-14/23. Колбы мерные 2-50-2; 2-100-2; 2-500-2. Воронка В-56-80 ХС. Колба коническая Кн-1-250-29/32. Цилиндры мерные 1-50, 1-100. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стеклянные банки с притертыми крышками, вместимостью 500, 1000 см³. Воронки делительные ВД-100-29/32, ВД-250-29/32. стакан В-1-50. Пипетки 1-2-2-5, 1-2-2-10. Палочка из химико-лабораторного стекла. Вата медицинская гигроскопическая. Бумага фильтровальная лабораторная. Пластинки хроматографические «Силуфол» производства Чехии, или «Сорбфил» (Россия), или «Merck» (ФРГ). Камера для хроматографирования: сосуд с плоским дном, закрывающийся шлифованной крышкой, стеклянный. Колонка стеклянная хроматографическая для очистки экстрактов из продуктов, содержащих жир: узкая часть — длина (50 ± 2) см, диаметр (1,7 ± 0,3) см, широкая часть — длина (1,5 ± 2) см, диаметр (2,5 ± 0,2) см.

РЕАКТИВЫ

Кислота серная, плотностью 1,84 г/см³. Гексан, ч, очищенный концентрированной серной кислотой, отмытый дистиллированной водой, высушенный кристаллическим гидроксидом калия и перегнанный с дефлегматором. Ацетон, хч, перегнанный. Аммиак водный, чда. Спирт этиловый ректификованный технический. Хлороформ, хч, перегнанный. Этилацетат перегнанный. Ацетонитрил, хч. Бензол, хч. 2-Феноксиэтанол. Водорода пероксид, 30%-ный раствор. Натрий сульфат безводный, ч. Натрий углекислый кислый, ч да. Серебро азотнокислое, хч. Силикагель марки АСК, измельченный и просеянный

через сито 0,30 мм. Вода дистиллированная. Уголь активированный любой марки. Бумага индикаторная универсальная для определения рН. Эталоны хлорорганических пестицидов: кельтана, ДДТ, ДДД, ДДЭ, ГХЦГ, альдрин, гептахлора гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%. Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ ОЧИСТКА СИЛИКАГЕЛЯ АСК

В стакан насыпают силикагель, заливают гексаном, перемешивают, гексан сливают. Промывку повторяют три раза. Промытый силикагель прокаливают при температуре 180 °С в течение 2 ч. Хранят в плотно закрытой стеклянной банке.

ОЧИСТКА ВАТЫ

В коническую колбу помещают вату, заливают гексаном, выдерживают 15 мин. Операцию повторяют два раза. Очищенную вату сушат на воздухе под тягой. Хранят в закрытой стеклянной банке.

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ОТ ЖИРОВ

В нижнюю часть колонки помещают кусочек очищенной ваты, насыпают силикагель АСК на высоту ($26,0 \pm 0,5$) см, уплотняют постукиванием по колонке деревянной палочкой. Затем помещают силикагель, пропитанный серной кислотой в отношении 4:1 (по массе), на 3 см, далее насыпают безводный сульфат натрия слоем ($1,0 \pm 0,5$) см. Через колонку пропускают 30 см³ гексана и отжимают резиновой грушей. Эффективность колонки проверяют, внося 5 см³ смеси хлорорганических пестицидов с заданной концентрацией (в пределах 0,1–0,2 мкг). Дают возможность раствору впитаться в колонку, а затем элюируют пестициды 50 см³ гексана со скоростью одна капля в секунду.

Элюат с помощью ротационного вакуумного испарителя полностью отгоняют при температуре 40 °С. К сухому остатку пипеткой добавляют 10 см³ гексана, колбу закрывают пробкой на шлифе. Стенки колбы ополаскивают растворителем и аликвотную часть раствора (5 мкл) вводят в хроматограф и проводят измерения. При определении не менее 90% от заданного количества пестицидов сорбент можно считать пригодным для работы, а колонку использовать для анализа. При

поступлении новой партии силикагеля проверяют его эффективность, как описано выше.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ ДЛЯ ПРОЯВЛЕНИЯ ПЯТЕН ПЕСТИЦИДОВ НА ПЛАСТИНКАХ ТСХ

Раствор 1. 0,5 г азотнокислого серебра растворяют в 5 см³ дистиллированной воды, прибавляют 10 см³ аммиака и доводят объем до 100 см³ ацетоном. Раствор хранят в течение 3 дней в холодильнике.

Раствор 2. 0,25 г азотнокислого серебра помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, приливают 2,5 см³ дистиллированной воды, 5 см³ 2-феноксиэтанола, доводят до метки ацетоном и добавляют 3 капли 30%-ного раствора пероксида водорода.

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КАМЕРЫ

В хроматографическую камеру за 1 ч до начала хроматографирования заливают смесь подвижных растворителей для насыщения ее парами. Объем подвижного растворителя в камере должен находиться на высоте не более чем 0,5 см от уровня дна.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ РАСТВОРОВ ПЕСТИЦИДОВ С МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ 100 МКГ/СМ³

Для приготовления основного раствора любого пестицида 10 мг эталонного препарата ГСО растворяют гексаном в мерной колбе вместимостью 100 см³ и доводят гексаном до метки. Хранят основные растворы в колбах с притертой пробкой в холодильнике в течение 6 мес.

ПОДГОТОВКА ПЛАСТИН СИЛУФОЛ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИ

Пластины «Силуфол» перед употреблением промывают. Для этого в хроматографическую камеру наливают систему растворителей ацетон-аммиак (1:1) на высоту 5–7 мм и помещают туда пластинки в вертикальном положении. После того, как линия фронта растворителя поднимется, не доходя 10 мм до верха пластинки, ее вынимают, высушивают на воздухе, затем активируют в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 30–60 мин. Перед употреблением с вертикальных сторон пластинки удаляют слой в 3 мм, что способствует выравниванию фронта растворителя.

АНАЛИЗ

Из объединенной пробы продукта отбирают навеску массой 50,0 г, помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью

250 см³ и заливают 100 см³ этилацетата. Содержимое колбы перемешивают в течение 20 мин на аппарате для встряхивания.

Экстракт декантируют в круглодонную колбу, пропуская через слой безводного серноокислого натрия. Эту операцию повторяют еще 2 раза. Экстракт объединяют и концентрируют с помощью ротационного испарителя досуха при температуре водяной бани 40–45 °С.

ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА

Сухой остаток количественно переносят с помощью 5 см³ гексана в делительную воронку вместимостью 100 см³, добавляют 5 см³ концентрированной серной кислоты и содержимое воронки осторожно встряхивают 5–10 раз. После разделения слоев нижний слой сливают и отбрасывают.

Очистку экстракта повторяют еще несколько раз. Очищенный экстракт промывают дважды раствором бикарбоната натрия с массовой долей 1% порциями по 5 см³, а затем дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Гексановый раствор количественно переносят в колбу грушевидной формы вместимостью 25 см³ и отгоняют на ротационном испарителе при температуре водяной бани 40–45 °С.

Если анализируют объекты, содержащие жир, то полученный экстракт подвергают дополнительной очистке на колонке. Сухой остаток растворяют в 10 см³ гексана, переносят на подготовленную колонку и элюируют пестициды с помощью 110 см³ смеси бензола с гексаном в соотношении 4:7 со скоростью одна капля в секунду. Элюат обезвоживают, пропуская через слой безводного серноокислого натрия и отгоняют растворитель досуха.

Для очистки экстракта от восков или твердых примесей полученный сухой остаток растворяют охлажденной смесью ацетона и воды в соотношении 2: 1 и выдерживают 30 мин в холодильнике. Воски отфильтровывают через бумажный фильтр, который промывают охлажденной смесью ацетона и воды 2:1. Пестициды экстрагируют из водно-ацетонового раствора гексаном. Растворитель упаривают.

Сухой очищенный остаток растворяют в колбе, внося пипеткой 1 см³ гексана. 0,1 см³ полученного раствора наносят микропипеткой или шприцем на хроматографическую пластинку на линию старта, находящуюся от края на расстоянии 1,0 см. Для увеличения чувствительности метода сухой остаток растворяют в нескольких каплях гексана и полностью наносят на пластинку. Справа и слева от пробы наносят стандартные растворы пестицидов, содержащие 1, 2, 4, 5, 10 мкг препарата.

После нанесения пробы на пластину типа «Силуфол» ее помещают в хроматографическую камеру с подвижным растворителем (№ 1) — гексан-ацетон (6:1) или (№ 2) — гексан (табл. 7.1). После того, как фронт растворителя поднимется по пластинке, ее вынимают из камеры, обрабатывают проявляющим реактивом и подвергают УФ-облучению в течение 5–10 мин лампой типа ПРК-4. Пластины располагают на расстоянии 20 см от источника света.

При отсутствии пластин «Силуфол» можно использовать пластины «Сорбфил» отечественного производства, с системой подвижных растворителей ацетонитрил-вода (2:1) (табл. 7.1).

Таблица 7.1

Ориентировочные значения R_f пестицидов в различных системах растворителей

Наименование пестицидов	Система растворителей		
	№ 1 гексан-ацетон (6:1)	№ 2 гексан	Ацетонитрил-вода (2:1)
	значение R _f на пластинках		значение R _f на
	«Силуфол» «Мерк»		пластинках «Сорбфил»
Кельтан	0,15	0,05	0,21
Гамма-ГХЦГ	0,23	0,15	0,30
ДДД	0,32	0,37	0,42
Гептахлор	0,57	0,45	0,73
ДДЭ	0,61	0,45	0,70
Альдрин	0,70	0,82	0,80
ДДТ	0,78	0,67	0,85

При наличии хлорорганических пестицидов при описанных выше условиях на пластинах проявляются пятна серо-черного цвета на светлом фоне. По значениям, соответствующих R_f определяют, какие пестициды присутствуют в продукте (табл. 7.1).

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение содержания пестицидов проводят путем сопоставления площади пятна испытуемого экстракта и площади пятна рабочего стандартного раствора, наиболее близкого по интенсивности окраски к пятну экстракта. Площади пятен измеряют с помощью линейки или шаблона из миллиметровой бумаги. Содержание пестицидов X, мг/кг, вычисляют:

$$X = m \cdot S_1 \cdot V_1 / m_1 \cdot S_2 \cdot V_2,$$

где m — масса пестицида в 1 см³ стандартного раствора, мкг; m_1 — масса навески исследуемого продукта, г; S_1 — площадь пятна, полученного при нанесении испытуемого экстракта, мм²; S_2 — площадь пятна, полученного при нанесении стандартного раствора, мм²; V_1 — объем экстракта, в котором перерастворен сухой остаток, см³; V_2 — объем исследуемого экстракта, нанесенного на пластинку, см³. При нанесении всей пробы $V_1 = V_2$.

Вычисления производят до первого десятичного знака. Окончательный результат округляют до целого числа.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 30% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания пестицидов любой пробы при допусках методом изменения влияющих факторов $\pm 0,15 X$.

Минимально обнаруживаемое содержание пестицидов в хроматографируемой пробе 1 мкг.

Значение среднего квадратичного отклонения случайной составляющей погрешности измерений содержания пестицидов одной и той же пробы при допусках методом изменения влияющих факторов составляет $\pm 0,2 X$.

При измерении содержания пестицидов определяемая величина варьирует в пределах: для гамма-ГХЦГ 75–80%, кельтана 75–85%, альдрина 72–80%, ДДТ 76–90%, ДДД 75–85%, ДДЭ 70%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРСОДЕРЖАЩИХ ПЕСТИЦИДОВ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) основан на экстракции пестицидов этилацетатом, очистке экстракта концентрированной серной кислотой или силикагелем АСК с последующим анализом хлорорганических пестицидов на газовом хроматографе с детектором захвата электронов.

Метод предназначен для анализа остаточных количеств пестицидов альфа-, бета-, гамма-ГХЦГ, кельтана, альдрина, гептахлора, ДДТ и его метаболитов.

Газохроматографический метод используют как самостоятельный метод анализа, а также для подтверждения результатов, полученных тонкослойной хроматографией.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с. Лампа ртутно-кварцевая типа ПРК-4. Колбы перегонные К-1–250–29/32. Колбы Гр-25–14/23. Колбы мерные 2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В-56–80 ХС. Колба коническая Кн-1–250–29/32. Цилиндры мерные 1–50, 1–100. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стеклянные банки с притертыми крышками, вместимостью 500, 1000 см³. Воронки делительные ВД-100–29/32, ВД-250–29/32. Стакан В-1–50. Пипетки 1–2–2–5, 1–2–2–10. Палочка из химико-лабораторного стекла. Вата медицинская гигроскопическая. Бумага фильтровальная лабораторная. Колонка стеклянная хроматографическая для очистки экстрактов из продуктов, содержащих жир: узкая часть — длина (50 ± 2) см, диаметр (1,7 ± 0,3) см, широкая часть — длина (1,5 ± 2) см, диаметр (2,5 ± 0,2) см.

Газовый хроматограф Газохром 1109 или аналогичный, например типа Varian, с детектором захвата электронов.

Микрошприц МШ10 или аналогичный для ввода 0,1–10 мкл пробы закомом через мембрану инжектора хроматографа.

Колонки хроматографические стеклянные для газового хроматографа длиной 1,0 м диаметром 3 мм и длиной 1,5 м, диаметром 3 мм.

Баллон стальной для сжатого газа, номинальное давление 150 ат.

Азот газообразный, марки «особой чистоты» или азот с содержанием кислорода не более 0,004% или гелий.

Насадки для колонки (наполнение набивных колонок): 5% OV-17 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм), 3% OV-210 на хроматоне N-супер (0,125–0,16 мм) или 5% SE-30 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм) или капиллярная колонка в соответствии с документацией к газовому хроматографу.

РЕАКТИВЫ

Кислота серная, плотностью 1,84 г/см³. Гексан, ч, очищенный концентрированной серной кислотой, отмытый дистиллированной водой, высушенный кристаллическим гидроксидом калия и перегнанный с дефлегматором. Ацетон, хч, перегнанный. Аммиак водный, чда. Спирт этиловый ректификованный технический. Хлороформ, хч, перегнанный. Этилацетат, хч, перегнанный. Ацетонитрил, хч. Бензол, хч. Водорода пероксид, 30%-ный раствор. Натрий сульфат безводный,

чда. Натрия гидрокарбонат, чда. Силикагель марки АСК, измельченный и просеянный через сито 0,30 мм. Вода дистиллированная. Уголь активированный любой марки. Бумага индикаторная универсальная для определения рН. Эталонные хлорорганических пестицидов: кельтана, ДДТ, ДДД, ДДЭ, ГХЦГ, альдрин, гептахлор гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%. Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

ОЧИСТКА СИЛИКАГЕЛЯ АСК

В стакан насыпают силикагель, заливают гексаном, перемешивают, гексан сливают. Промывку повторяют три раза. Промытый силикагель прокаливают при температуре 180 °С в течение 2 ч. Хранят в плотно закрытой стеклянной банке.

ОЧИСТКА ВАТЫ

В коническую колбу помещают хлопковую вату, заливают гексаном, выдерживают 15 мин. Операцию повторяют два раза. Очищенную вату сушат на воздухе под тягой. Хранят в закрытой стеклянной банке.

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ОТ ЖИРОВ

В нижнюю часть колонки помещают кусочек очищенной ваты, насыпают силикагель АСК на высоту ($26,0 \pm 0,5$) см, уплотняют постукиванием по колонке деревянной палочкой. Затем помещают силикагель, пропитанный серной кислотой в отношении 4:1 (по массе), на 3 см, далее насыпают безводный сульфат натрия слоем ($1,0 \pm 0,5$) см. Через колонку пропускают 30 см³ гексана и отжимают резиновой грушей. Эффективность колонки проверяют, внося 5 см³ смеси хлорорганических пестицидов с заданной концентрацией (в пределах 0,1–0,2 мкг). Дают возможность раствору впитаться в колонку, а затем элюируют пестициды 50 см³ гексана со скоростью одна капля в секунду.

Элюат с помощью ротационного вакуумного испарителя полностью отгоняют при температуре 40 °С. К сухому остатку пипеткой добавляют 10 см³ гексана, колбу закрывают пробкой на шлифе. Стенки колбы ополаскивают растворителем, алиquotную часть раствора

(5 мкл) вводят в хроматограф и проводят измерения. При определении не менее 90% от заданного количества пестицидов сорбент можно считать пригодным для работы, а колонку использовать для анализа. При поступлении новой партии силикагеля проверяют его эффективность, как описано выше.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГРАДУИРОВАННЫХ РАСТВОРОВ ПЕСТИЦИДОВ

Основные градуировочные растворы с массовой концентрацией ($100 \pm 0,5$) мкг/см³ готовят весовым способом отдельно для каждого пестицида путем растворения навески 10 мг в мерной колбе вместимостью 100 см³ в гексане. Из основных растворов готовят промежуточные градуировочные растворы массовых концентраций: 1 мкг/см³ (раствор 1), 0,1 мкг/см³ (раствор 2) и 0,01 мкг/см³ (раствор 3), перенося пипеткой в мерные колбы вместимостью 100 см³ соответственно 1 и 0,1 см³ основного раствора пестицида. Для приготовления промежуточного раствора 3 с содержанием 0,01 мкг/см³ в мерную колбу вместимостью 100 см³ переносят 1 см³ промежуточного раствора 1 и доводят до метки гексаном.

Все промежуточные растворы стабильны при хранении в колбах с притертой пробкой в холодильнике в течение 6 мес.

ПОДГОТОВКА ГАЗОВОГО ХРОМАТОГРАФА ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ

Сухую стеклянную колонку, предварительно промытую хромовой смесью, этиловым спиртом, затем диэтиловым эфиром, заполняют носителем с помощью вакуумного или водоструйного насоса. При этом набивку колонки периодически уплотняют, постукивая по колонке деревянной палочкой. Установленную в термостате хроматографическую колонку перед работой кондиционируют в следующем режиме: 2 ч при 100 °С; 2 ч при 150 °С; 4 ч при 200 °С; 4 ч при 220 °С. При кондиционировании колонка должна быть отключена от детектора. Кондиционирование следует проводить при смене колонки, а также после длительных перерывов в работе. При использовании капиллярной колонки проводят ее подготовку в соответствии с технической документацией к прибору.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ШКАЛЫ ГРАДУИРОВАННЫХ РАСТВОРОВ

В пробирках вместимостью 5 см³ с пробками на шлифах для каждого пестицида готовят шкалу градуировочных растворов (табл. 7.2–

7.4). Для этого пипетками вносят определенный объем промежуточных растворов пестицидов и недостающий до 5 см³ объем гексана.

Таблица 7.2

Шкала градуировочных растворов для альфа-ГХЦГ и 4,4'-ДДЭ

Раствор	1	2	3	4	5	6	7	8
Объем промежуточного раствора 3 (0,01мкг/мл), мл	1	2	5	—	—	—	—	—
Объем промежуточного раствора 2 (0,1 мкг/мл), мл	—	—	—	1	2	3	4	5
Объем гексана, мл	4	3	0	4	3	2	1	0
Количество пестицида в градуировочном растворе, мкг/мл	0,002	0,004	0,01	0,02	0,004	0,06	0,08	0,1
Количество пестицида в 5 мкл пробы, нг	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0

Таблица 7.3

Шкала градуировочных растворов для β и γ-ГХЦГ, альдрин и гептахлора

Раствор	1	2	3	4	5	6	7
Объем промежуточного раствора 3 (0,01 мкг/мл), мл	3	5	—	—	—	—	—
Объем промежуточного раствора 2 (0,1 мкг/мл), мл	—	—	1	2	3	4	5
Объем гексана, мл	2	0	4	3	2	1	0
Количество пестицида в градуировочном растворе, мкг/мл	0,006	0,01	0,02	0,02	0,06	0,08	0,1
Количество пестицида в 5 мкл пробы, нг	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

Таблица 7.4

Шкала градуировочных растворов для 4,4'-ДДТ и 4,4'-ДДД

Раствор	1	2	3	4	5	6	7	8
Объем промежуточного раствора 2 (0,1 мкг/мл), мл	0,5	1	2	3	4	5	—	—
Объем промежуточного раствора 1 (1 мкг/мл), мл	—	—	—	—	—	—	1	2
Объем гексана, мл	4,5	4	3	2	1	0	4	3
Количество пестицида в градуировочном растворе, мкг/мл	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,2	0,4
Количество пестицида в 5 мкл пробы, нг	0,05*	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1	2

* Градуировочные растворы хранят не более двух недель. При проверке градуировочных графиков готовят свежие градуировочные растворы.

Таблица 7.5

Условия разделения хлорорганических пестицидов на колонках методом ГЖХ

Параметры	Колонка 1		Колонка 2		Колонка 3	
	5% OV-17 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм)		3% OV-210 на хроматоне N-супер (0,125–0,16 мм)		5% SE-30 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм)	
Насадка колонки	5% OV-17 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм)		3% OV-210 на хроматоне N-супер (0,125–0,16 мм)		5% SE-30 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм)	
Длина колонки (см) и внутренний диаметр (мм)	100x3	100x3	100x3	100x3	150x3	150x3
Температура колонки, °С	170	210	160	190	190	190
Температура испарителя, °С	220	220	220	220	210	210
Температура детектора, °С	230	230	230	230	230	230
Скорость потока газа-носителя, см ³ /мин.	40	40	35	35	60	60
Объем вводимой пробы, мкл	5	5	5	5	5	5
Время удерживания пестицидов:						
альфа-ГХЦГ	3 мин		3 мин		1 мин	
бета-ГХЦГ	4 мин		5 мин		2 мин	
гамма-ГХЦГ	5 мин		4 мин		2 мин	
Кельтан			12мин		4 мин	
Гептахлор			6 мин		2 мин	
Альдрин			6 мин		3 мин	
ДДЭ			4 мин		4 мин	
ДДД			6 мин		7 мин	
ДДТ			7 мин		11мин	
Линейный диапазон определения, мг:						
альфа-ГХЦГ	0,01–0,20				0,03–0,30	
бета-ГХЦГ	0,03–0,30				0,03–0,4	
гамма-ГХЦГ	0,03–0,50				0,03–0,5	
альдрин	0,02–0,2				0,01–0,3	
кельтан	0,01–0,2				0,01–0,2	
гептахлор	0,03–0,3				0,03–0,5	
ДЦЭ	0,05–0,5				0,01–0,1	

Окончание

Параметры	Колонка 1	Колонка 2	Колонка 3
Насадка колонки	5% OV-17 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм)	3% OV-210 на хроматоне N-супер (0,125–0,16 мм)	5% SE-30 на хроматоне N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм)
ДДД	0,05–0,5		0,1–1,0
ДДТ	0,10–0,5		0,1–2,0

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Из объединенной пробы продукта отбирают навеску массой 50,0 г, помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 см³ и заливают 100 см³ этилацетата. Содержимое колбы перемешивают в течение 20 мин на аппарате для встряхивания.

Экстракт декантируют в круглодонную колбу, пропуская через слой безводного сернокислого натрия. Эту операцию повторяют еще 2 раза. Экстракт объединяют и концентрируют с помощью ротационного испарителя досуха при температуре водяной бани 40–45 °С.

ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА

Сухой остаток количественно переносят с помощью 5 см³ гексана в делительную воронку вместимостью 100 см³, добавляют 5 см³ концентрированной серной кислоты и содержимое воронки осторожно встряхивают 5–10 раз. После разделения слоев нижний слой сливают и отбрасывают. Очистку экстракта повторяют еще несколько раз. Очищенный экстракт промывают дважды раствором бикарбоната натрия с массовой долей 1% порциями по 5 см³, а затем дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Гексановый раствор количественно переносят в колбу грушевидной формы вместимостью 25 см³ и отгоняют на ротационном испарителе при температуре водяной бани 40–45 °С.

Если анализируют объекты, содержащие жир, то полученный экстракт подвергают дополнительной очистке на колонке. Сухой остаток растворяют в 10 см³ гексана, переносят на подготовленную колонку и элюируют пестициды с помощью 110 см³ смеси бензола с гексаном в соотношении 4:7 со скоростью одна капля в секунду. Элюат обезжиривают, пропуская через слой безводного сернокислого натрия и отгоняют растворитель досуха.

Для очистки экстракта от восков или твердых примесей полученный сухой остаток растворяют охлажденной смесью ацетона и воды в соотношении 2:1 и выдерживают 30 мин в холодильнике. Воски отфильтровывают через бумажный фильтр, который промывают охлажденной смесью ацетона и воды 2:1. Пестициды экстрагируют из водно-ацетонового раствора гексаном. Растворитель упаривают.

Сухой очищенный остаток растворяют в колбе, внося пипеткой 10 см³ гексана.

УСЛОВИЯ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

5 мкл гексанового раствора вводят в испаритель газового хроматографа и анализируют в условиях, указанных в табл. 7.5.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание пестицидов X мг/кг, в анализируемом сырье вычисляют в соответствии с градуировочными графиками по формуле:

$$X = m_1 \cdot V_1 / m_2 \cdot V_2,$$

где m₁ — масса пестицида, найденная по градуировочному графику, мкг; V₁ — общий объем раствора, из которого взята аликвота для хроматографирования, мл; m₂ — масса анализируемой пробы, г; V₂ — объем аликвоты, вводимой в хроматограф, мкл.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому при p = 0,95.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания пестицидов в любой пробе при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов ± 0,15X.

При измерении содержания пестицидов в образцах полнота обнаружения может варьировать для альфа-ГХЦГ в пределах 75–89%, бета-ГХЦГ 73–85%, гамма-ГХЦГ (линдан) 77–88%, ДДТ 75–85%, ДДЭ 65–72%, ДДД 75–86%, гептахлора 70–89%, кельтана 73–85%, альдрина 80–95%.

Минимально обнаруживаемые количества анализируемых соединений с помощью газожидкостной хроматографии составляют: для альфа-, бета-, гамма-ГХЦГ — 0,001 нг, для гептахлора, альдрина и кельтана — 0,01 нг, для ДДТ, ДДЭ и ДДД — 0,6 нг.

Нижний предел измерения: 0,001 мг/кг для гамма-ГХЦГ, 0,005 мг/кг для кельтана и гептахлора, 0,007 мг/кг для ДДТ и его метаболитов.

Значение среднего квадратичного отклонения случайной составляющей погрешности измерений содержания пестицидов одной и той же пробы в разных лабораториях при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов составляет $\pm 0,2X$.

Расхождение между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать 40% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ К ГЛАВЕ 7

1. Опасность органических токсикантов. Уровень содержания. Почему определение количественного содержания остаточных органических микропримесей является важной аналитической задачей подтверждения безопасности продукции?

2. Какова точность определения содержания органических примесей различными методами?

3. Как согласуется безопасный уровень содержания конкретного вещества и границы диапазона аналитического определения?

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 7

Майстренко, В. Н., Хамитов, Р. З., Будников, Г. К. Эколого-аналитический мониторинг супертоксиантов. — М.: Химия, 1996. — 319 с.

Аналитическая химия: проблемы и подходы: в 2 т. Пер. с англ. под ред. акад. Ю. А. Золотова. — М.: Мир «АСТ», 2004.

Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. В двух томах. — Т. 1/Сост. Клисенко М. А., Калинина А.А, Новикова К. Ф. и др. — М.: Колос, 1992. — 567 с.

Инженерная экология: Учебник/Под ред. проф. В. Т. Медведева. — М.: Гардарики, 2002. — 687 с.

Эйхлер, В. Яды в нашей пище: Пер. с нем, — 2-е доп. изд. — М.: Мир, 1993.

Мовчан, В. Н. Экология человека. — С. — Пб: Изд-во С.-Петербургского университета, 2004. — 290 с.

Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Справочное издание. — М.: Минсельхоз России, 2018. — 936 с.

Глава 8

АНАЛИТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЖИВЫХ И БИОСИСТЕМ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

8.1. АНАЛИЗ БЕЛКОВ

Белки — важнейшие органические соединения, входящие в состав всех известных живых организмов, а также продуктов их переработки. Составляя основу цитоплазмы клеток и также входя в состав многих структурообразующих веществ, например костей и соединительной ткани, белки выполняют основную роль в жизнедеятельности живых организмов.

Таблица 8.1

Основной химический состав объектов различного происхождения

Наименование	Белок, %	Вода, %	Минеральные соли, %
Мышечная ткань животных	18–22	66–76	0,9–1,2
Яйцо птицы	12–13	73–74	1–1,1
Рогокопытная ткань животного происхождения	77–90	5–9	1–2
Кость животная	15–25	15–40	37–54
Микроорганизмы			
<i>E. coli</i>	14–15	69–72	0,5–0,8
<i>Sach. Sereviciae</i>	12–14	70–72	0,5–0,7
Кровь млекопитающих	18	75–80	0,4–0,6
Овощи	1–2	75–92	0,5–1,5
Фрукты	0,5–1,2	85–90	0,3–1
Мышечная ткань рыб	14–21	70–82	0,9–1,6
Пшеничное зерно	10–11,5	13,5–14	1,5–3
Молоко млекопитающих	1–6	80–88	0,4–1

Белковый состав является существенным медицинским показателем здорового функционирования человека, а также неотъемлемой характеристикой пищевых композиций, продуктов питания человека и сельскохозяйственных кормов.

Сложность аналитических определений белковых систем заключаются в том, что белки не являются индивидуальными химическими соединениями. Употребляя термин «общий белок», «содержание белка» или просто «белок» подразумевается, что речь идет о сумме множества белков различного строения полипептидной цепи на уровне составляющих аминокислот и молекулярной массы, входящих в данный объект.

В табл. 8.1 приведено среднее суммарное содержание белковых веществ — «белка» в объектах различного происхождения.

Белки, содержащиеся в различных объектах, проявляют различные свойства. Эти свойства можно рассматривать с двух точек зрения.

Во-первых, биофизические и физико-химические свойства белков, определяющие физическую форму, механическую прочность, цветность, а также питательную ценность белок содержащих веществ.

Во-вторых, доступность белка с точки зрения возможности его использования, выделения из образца для последующего количественного анализа, а также его доступность в сочетании с аминокислотным составом для процесса переваривания, то есть проявления питательных свойств.

Количественное определение содержания белка в конкретном образце или растворе является важной прикладной задачей. Поскольку в виде примесей в растворе или в твердом образце могут содержаться химические вещества различной природы, приходится использовать разные методы количественного анализа для определения содержания белка.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА СРАВНЕНИЕМ ПОГЛОЩЕНИЯ ПРИ 215 И 225 НМ

Количественное определение белка в ультрафиолетовой области основано на способности пептидной связи поглощать при длинах волн меньше 230 нм. Концентрация растворимого белка в пределах 10–100 мкг/мл может быть определена по разности поглощений при 215–225 нм. Определению белка данным методом может мешать высокое содержание примесных солей в буферах с концентрацией больше 0,5 мМ. Для получения достоверных результатов раствор белка следует подвергать значительному разбавлению.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Изучаемый раствор белка с концентрацией от 10 до 100 мкг/мл. спектрофотометр с кюветами. пробирки.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В соответствии с инструкцией по эксплуатации подготавливают к работе спектрофотометр. В кювету заливают раствор белка и проводят измерение поглощения раствора при 215 и 225 нм. Концентрацию белка (С, мкг/мл) рассчитывают по формуле: $C = 144 (D_{215} - D_{225})$, где D_{215} и D_{225} — поглощение раствора при 215 и 225 нм.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ

Метод используют для определения содержания общего белка в образце при наличии уверенности в том, что весь определяемый белок удастся растворить

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 М растворе NaOH . 0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе тартрата натрия (калия) или тринатрийцитрате. Смесь 1 мл раствора 2 с 50 мл раствора 1, приготовленная перед началом определения. Реактив Фолина-Чокальтеу. Растворяют 50 г вольфрамата натрия Na_2WO_4 и 12,5 г молибдата натрия Na_2MoO_4 в 350 мл воды, к полученному раствору приливают 25 мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты, 50 мл концентрированной соляной кислоты и смесь кипятят с обратным холодильником в течение 10 ч. Затем добавляют 75 г лития сульфата, 25 мл воды, 3–5 капель брома и кипятят без холодильника в течение 15 мин под тягой для удаления избытка брома. Раствор охлаждают до комнатной (20 °С) температуры и доводят водой до объема 500 мл, перемешивают и фильтруют. Из фильтрата отбирают 1 мл, разводят в 10 раз водой, титруют 0,1 М раствором NaOH до нейтральной реакции по фенолфталеину. После чего к раствору добавляют такое количество воды, чтобы получить конечную концентрацию кислоты в растворе, равную 1 н. Реактив хранить в темной склянке с притертой пробкой в холодильнике. Перед употреблением реактив Фолина развести водой 1:1. Испытуемый раствор белка с концентрацией от 25 до 500 мкг/мл. Спектрофотометр с кюветами, пробирки, пипетки.

Метод основан на сочетании биуретовой реакции на пептидные связи и реакции Фолина на ароматические аминокислоты. Метод яв-

ляется достаточно надежным и позволяет определять плохо растворимые белки после их кипячения в 0,1 М растворе NaOH и получения раствора с концентрацией 25–500 мкг белка в 1 мл. Разные белки дают заметно различающиеся величины поглощения в методе Лоури-Фолина, отчасти это зависит от содержания тирозина и триптофана.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для построения калибровочной кривой в 6 пробирок вносят 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 мл стандартного раствора белка с известной концентрацией, содержащего 0,25 мг/мл вещества (то есть 25, 50, 100, 150, 200 и 250 мкг) и доводят водой объем проб до 1 мл. В 7-ю пробирку вносят 1 мл воды (контрольная проба). Во все пробирки прибавляют по 5 мл смеси растворов 1 и 2 и оставляют при температуре 18–25 °С в течение 10 мин. Затем добавляют 0,5 мл реактива Фолина, разбавленного 1:1, и оставляют на 30 мин, после чего измеряют интенсивность окрашенных в синий цвет растворов при 750 нм на спектрофотометре или на фотоэлектроколориметре с красным фильтром против контрольной пробы.

Величины оптической плотности (D) для 6 растворов откладывают на оси ординат, а значения концентрации белка (C, мкг/мл) — на оси абсцисс и получают калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации белка (рис. 8.1).

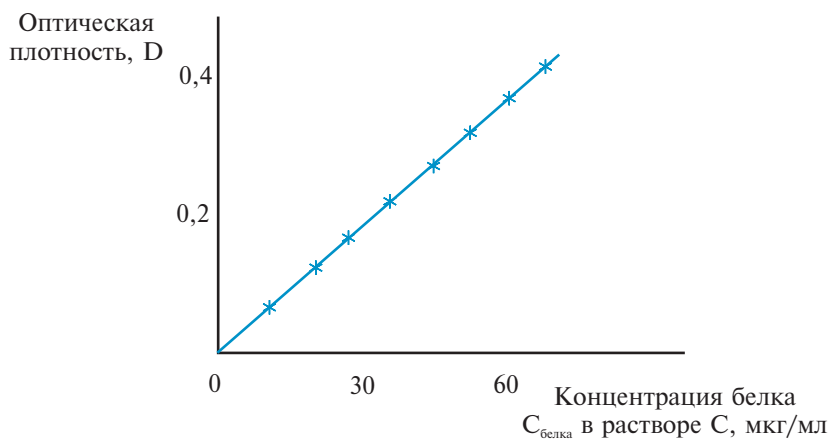


Рис. 8.1. Калибровочный график, построенный по стандартным растворам белка с известной концентрацией

СОДЕРЖАНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА ПО ДАННЫМ ЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗОТА. МЕТОД ЙЕНИКЕ-КЪЕЛЬДАЛЯ

Метод удобен для определения белка в нерастворимых биологических объектах, например в клеточной биомассе или мясопродуктах. Принимается, что в белках содержится в среднем 16% азота. Найденное по Кьельдалю количество азота умножают на 6,25, чтобы определить количество белка животного происхождения в растворе с последующим пересчетом на массу взятого образца.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Стандартный раствор аммония сульфата, содержащий 6 мкг азота в 1 мл. Фенольный реактив. Для получения комплекса 1 мл 85%-ного раствора фенола смешивают с 2,5 мл 0,2%-ного раствора нитропруссиды натрия и 36,5 мл воды. Щелочной раствор гипохлорита: 0,02 М NaClO в 2,5 М растворе NaOH. 4. 57%-ный раствор HClO₄. Термошкаф (210 °С), спектрофотометр с кюветами, пробирки, бюретки с реактивами.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для построения калибровочного графика в 5 пробирок вносят 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 мл стандартного раствора аммония сульфата с известной концентрацией азота, равной 6 мкгN/мл и доводят общий объем раствора в каждой пробирке водой до 1 мл. В 6-ю пробирку вносят 1 мл воды (холостая проба). Во все пробирки добавляют по 0,1 мл 57%-ного раствора HClO₄, 1 мл фенольного реактива и 0,4 мл щелочного раствора гипохлорита. Выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре и измеряют поглощение при 580 нм или при зеленом (оранжевом) светофильтре на фотоэлектроколориметре.

Величины оптической плотности (D) для пяти растворов откладывают на оси ординат, а значения концентрации азота (C, мкг/мл) — по оси абсцисс и получают калибровочный график зависимости оптической плотности от содержания азота.

К 0,1 мл раствора белка, содержащего примерно 0,5 мг/мл, прибавляют 0,1 мл 57%-ного HClO₄, пробирку прикрывают неплотно стеклянной пробкой и ставят на минерализацию, выдерживая пробу в течение 20 мин при температуре 210 °С в термошкафу, затем пробу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 1 мл воды, 1 мл фенольного реактива, 0,4 мл щелочного раствора гипохлорита, смесь

выдерживают в течение 20 мин и измеряют поглощение при 580 нм. По калибровочному графику находят количество азота в исследуемом растворе. Найденное количество азота умножают на 6,25, чтобы определить количество белка в растворе, мкг/мл. Зная общую массовую концентрацию растворенного вещества, рассчитывают массовое содержание белка в образце в процентах.

Результат представляют с точностью до десятого знака после запятой.

Ошибка определения составляет $\pm 20\%$ определяемой величины.

8.2. ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ

Существенную роль в различных областях играют ферменты, которые представляют собой специфические белки определенной молекулярной массы, как правило, от 10 до 300 кДа, способствующие протеканию различных биохимических реакций в живом организме, а также при получении различных веществ биотехнологическим способом.

Свойства белков, проявляющих энзиматическую активность, оценивают по удельной каталитической активности фермента, выраженной в ЕД/г массы вещества или в ЕД/мл раствора (ед/г или ед/мл, u/g, u/mg, u/ml). Наибольший интерес представляет оценка специфической (пептидазной — расщепления белков, липазной — расщепления жиров и амилолитической — расщепления углеводов) активности белковых ферментов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПАНКРЕАТИНА

Панкреатин представляет собой полиферментный препарат, применяемый в качестве лекарственного вещества в медицинской практике и получаемый из поджелудочной железы убойного скота. В панкреатине в качестве основных компонентов содержится комплекс протеиназ и амилаз, поэтому панкреатин проявляет протеолитическую (протеазную) и амилолитическую (амилазную) активности. Протеазная активность панкреатина обуславливает способность расщеплять белки и пептиды, а амилазная активность проявляется в способности гидролизовать крахмал.

За единицу амилолитической активности принимается такое количество фермента, которое в данных условиях эксперимента гидролизует крахмал со скоростью образования одного микроэквивалента декстринов в одну минуту.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

1. 1%-ный раствор крахмала. Раствор готовят суспензированием 1 г растворимого крахмала (ГОСТ 10163–76) в 25 мл дистиллированной воды при температуре 30–40 °С с последующим добавлением 75 мл кипящей воды. Раствор кипятят, перемешивая, в течение 3 мин. Срок хранения раствора не более 2 сут.

2. Фосфатный буфер pH 6,8. Готовят раствор 1 растворением 27,2 г монофосфата калия KH_2PO_4 в 1 л дистиллированной воды. Раствор 2 получают растворением 71,5 натрия фосфорнокислого двузамещенного $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 1 л дистиллированной воды. Смешивают 1:1 растворы 1 и 2.

3. 0,2 М раствор хлорида натрия. Раствор готовят растворением 0,58 г NaCl в 50 мл воды.

4. Раствор препарата, свежеприготовленный. Навеску 0,06 г фермента (панкреатина) растворяют в мерной колбе в 50 мл фосфатного буфера pH 6,8 и доводят объем раствора до 100 мл добавлением фосфатного буфера pH 6,8.

5. 2 М раствор HCl .

6. 0,1 М раствор йода. Раствор готовят растворением 13 г йода кристаллического I_2 и 36 г калия йодида KJ в 50 мл воды с последующим доведением объема раствора водой до объема 1 л.

7. Раствор серной кислоты (3,5 М). Разбавленный раствор готовят смешением четырех объемов воды и одного объема концентрированной H_2SO_4 .

8. 0,1 М раствор тиосульфата натрия. Раствор готовят растворением 24,8 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 л дистиллированной воды. Перед использованием проводят контрольное титрование 0,1 М раствором йода (готовят из фиксанала) с крахмалом для определения поправочного коэффициента (К).

9. Вода дистиллированная.

10. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 30–40 °С. Секундомер. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. В две конические колбы Эрленмейера со шлифами вместимостью 250 мл вносят по 25 мл 1%-ного раствора крахмала, 10 мл фосфатного буфера pH 6,8, 1 мл 0,2 М раствора хлорида натрия, закрывают пробками, помещают в термостат с температурой $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и выдерживают в течение 10 мин.

2. Затем в колбу № 1 (опытная проба) прибавляют 1 мл раствора препарата, быстро перемешивают, возвращают колбу в термостат и включают секундомер. В колбу № 2 (контроль) прибавляют по 1 мл 2 М раствора HCl и раствора препарата, перемешивают и возвращают в баню.

Через 10 мин после прибавления раствора препарата в колбу № 1 вносят 1 мл 2 М раствора HCl (останавливают процесс работы фермента), колбы вынимают и охлаждают до комнатной температуры (можно под струей холодной воды).

3. 3. В каждую колбу вносят по 20 мл дистиллированной воды, 10 мл 0,1 М раствора иода и сразу же 45 мл 0,1 М раствора NaOH. Колбы помещают в шкаф, в темное место и выдерживают в течение 15 мин.

4. 4. После выдержки в колбы, содержащие избыток непрореагировавшего иода, прибавляют по 4 мл раствора серной кислоты, 2 капли раствора крахмала и титруют 0,1 М раствором тиосульфата натрия.

РАСЧЕТ

Активность (А) препарата в амилолитических единицах на грамм определяют по формуле:

$$A, \text{ ЕД/г} = 100 / [1 - 5(v - a) - 0,006] \cdot m,$$

где: v — количество мл 0,1 М раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование контрольной пробы; a — количество мл 0,1 М раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование опытной пробы; m — навеска препарата, г.

Активность 1 г качественного фермента не должна быть меньше 10 000 ЕД.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ РНКАЗУ

Высокое содержание нуклеиновых компонентов в живых клетках и тканях, например до 6–12% масс. в дрожжах, до 16% масс. в бактериях, регулируется наличием белковых ферментов, обладающих нуклеазной активностью. Ферменты с такой активностью применяются в научных исследованиях и в различных биотехнологических процессах.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

1. 0,2 М ацетатный буфер pH 5,0. Раствор готовят смешением 70 мл 0,2 М раствора ацетата натрия, содержащего 27,22 г/л

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, и 30 мл 0,2 М раствора уксусной кислоты, содержащего 11,5 мл ледяной CH_3COOH в 1 л раствора.

2. 0,75%-ный раствор уранилацетата в 25%-ном растворе HClO_4 . Раствор готовят растворением 0,75 г $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 99,75 г (85,6 мл) 25%-ного раствора HClO_4 , приготовленного смешением 50 мл концентрированного, 68%-ного раствора HClO_4 с 86 мл дистиллированной воды.

3. Ферментный препарат, содержащий РНКазу (5–10%-ная суспензия пивных дрожжей).

4. 0,8% раствор РНК.

5. Вода дистиллированная.

6. Спектрофотометр с кюветами 1 см. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл, пробирки, градуированные пипетки. Холодильник или лед. Воронки с фильтровальной бумагой. Центрифуга на 5000 об/мин. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 20–30 °С.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. В пробирки вносят по 0,4 мл 0,2 М ацетатного буфера pH 5,0 и 0,5 мл 0,8%-ного раствора РНК. В первую колбу вносят 0,5 мл 0,75%-ного раствора уранилацетата в 25%-ном растворе HClO_4 (контрольная проба) для подавления активности фермента. В обе пробирки вносят по 0,4 мл исследуемого раствора фермента и выдерживают в течение 25 мин при температуре 25 °С. После выдержки во вторую пробирку прибавляют 0,5 мл 0,75%-го раствора уранилацетата в 25%-м растворе HClO_4 .

2. В обе пробирки приливают по 1,2 мл воды и оставляют в холодильнике при температуре +4 °С на 30 мин. Образующийся осадок отделяют фильтрацией через слой фильтровальной бумаги или центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин.

3. 0,1 мл фильтрата смешивают с 3 мл дистиллированной воды и измеряют поглощение при 260 нм.

РАСЧЕТ

Активность (А) препарата в нуклеазных единицах на миллилитр раствора определяют по формуле:

$$A, \text{ ЕД/мл} = (1 / 0,4) \cdot (D_1 - D_2) P,$$

где: $D_1 - D_2$ — разность оптических плотностей опытной и контрольной проб; P — разведение исходного ферментного раствора; 0,4 — объем ферментного раствора, взятого на анализ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Ряд микробных ферментов, например сериновая протеаза из *Staphylococcus aureus*, имеет молекулярную массу 27000, $E_{280} = 11,5$, оптимум pH 4,0–7,8 по гемоглобину и обладает способностью к специфическому расщеплению полипептидной цепи по COOH-концам аминокислотных остатков Asp или Glu. Ингибиторами протеазы являются диизопропилфторфосфат и некоторые анионы: Cl^- , F^- , CH_3COO^- , NO_3^- , Br^- . Многие другие ферментные препараты также обладают пептидазной активностью.

За единицу пептидазной активности (ЕД) принимается количество фермента, которое высвобождает растворимые аминокислоты эквивалентно изменению скорости поглощения раствора $0,001D_{280}$ в минуту при температуре $37^\circ C$ и pH 7,8.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

1. 1%-й раствор казеина в 0,05 М Трис-PO₄ буфере pH 7.0. Готовят растворением 1 г не содержащего витаминов казеина в 50 мл 0,01 М (0,4 г/л) NaOH. К раствору добавляют 40 мл дистиллированной воды и 5 мл 1 М раствора Триса, который получен растворением 121,14 г трис(гидроксиметил)аминометана $NH_2C(CH_2OH)_3$ в 1 л воды, устанавливают pH раствора равным 7.0, добавляя концентрированный раствор H_3PO_4 , и доводят общий объем раствора до 100 мл.

2. 10%-й раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Растворяют 10 г CCl_3COOH в 90 мл воды.

3. 1 мг/мл раствор ферментного препарата. Готовят растворением чистой протеазы или используют клеточные биопрепараты.

4. Спектрофотометр с кюветами 1 см. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл, пробирки, градуированные пипетки. Холодильник или лед, термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале $30-40^\circ C$. Воронки с фильтровальной бумагой.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. В две пробирки вносят по 5 мл 1%-го раствора казеина, термостатируют при температуре $37^\circ C$ в течение 5 мин, добавляют в 1-ю пробирку 10 мл дистиллированной воды (контроль), во 2-ю — 1 мл раствора ферментного препарата (проба). Добавляемый объем раствора может быть уменьшен до 20 мкл в зависимости от активности фермента. Пробы перемешивают и выдерживают при температуре $37^\circ C$ в течение 10 мин.

2. В обе пробирки добавляют по 5 мл раствора ТХУ, выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре и фильтруют через бумажные фильтры.

3. Замеряют на спектрофотометре значение оптической плотности против контроля.

РАСЧЕТ

Рассчитывают значение протеазной активности (А) по формуле:

$$A, \text{ ЕД/мг} = (D_{280} \text{ пробы} - D_{280} \text{ контроль}) / 10 \text{ г},$$

где: $(D_{280} \text{ пробы} - D_{280} \text{ контроль})$ — разность значений оптических плотностей растворов пробы и контроля; 10 — время, мин; г — содержание фермента (навеска) во взятом на определение объеме раствора (в 10 мл). При анализе неизвестного ферментного раствора допускается вместо значения г использовать значение объема раствора, тогда найденная активность будет выражаться в ЕД/мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПОЛИТИЧЕСКОЙ (ЛИПАЗНОЙ) АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности и пределом допустимой погрешности 0,2 мг. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Колбы со шлифом вместимостью 50–1000 мл. Гомогенизатор типа микроразмельчителя тканей РТ-2. стакан или колба вместимостью 1 дм³ с мешалкой и баней для подогрева. pH-метр. Мерная колба вместимостью 1 дм³. Устройство для фильтрования растворов через бумажный фильтр. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале $20-100^\circ C$. Колба Эрленмейера вместимостью 200 мл. Бюретка на 50–100 мл.

Соляная кислота, хч, 0,1 М раствор. Поливиниловый спирт. Натрия гидроксид, чда, 0,05 М и 0,1 М раствор. (Трисгидроксиметил)аминометан. Натрия хлорид хч. Фенолфталеин чда, 1% спиртовой раствор. Масло оливковое. Этанол 95% ректифицированный.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

20 г поливинилового спирта смешивают с 800 мл воды в течение 30 мин, добавляют 0,5 мл 0,1 М раствора HCl, термостатируют смесь при

перемешивании в течение 1 ч при 90 °С, охлаждают до комнатной температуры и устанавливают рН раствора 7,0 добавлением 0,1 М раствора NaOH. Раствор количественно переносят в мерную колбу, доводят объем до 1 дм³ и фильтруют через бумажный фильтр. Срок хранения раствора 1 месяц.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА СУБСТРАТА

Смесь из 16 мл оливкового масла и 24 мл раствора поливинилового спирта перемешивают в стакане размельчителя тканей при 5000 об/мин в течение 15 мин. Субстрат готовят непосредственно перед использованием и не хранят.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТРИС-HCL БУФЕРНОГО РАСТВОРА (рН 9,0)

0,606 г трис(гидроксиметил)аминометана и 2,34 г натрия хлорида растворяют в 800 мл дистиллированной воды, доводят рН раствора до 9,0 добавлением 0,1 М раствора HCl и доводят объем раствора до 1 л.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ 0,01% РАСТВОРА ЛИПАЗЫ

0,01 г ферментного препарата растворяют в 90 мл дистиллированной воды, доводят объем раствора до 100 мл добавлением буферного раствора и фильтруют через бумажный фильтр. Используют свежеприготовленный раствор.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В исследуемую колбу вносят 5 мл субстрата, 25 мл трис-буферного раствора рН 9, перемешивают, закрывают пробкой и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 10 мин, прибавляют 1 мл раствора испытуемого фермента, перемешивают и термостатируют при температуре 37 °С в течение 1 ч.

К смеси добавляют 20 мл этанола и количественно переносят с помощью 50 мл этанола, используемого для смыва, в колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 0,5 мл раствора фенолфталеина и титруют 0,05 М раствором NaOH до появления розовой окраски.

В отдельную колбу вместимостью 50 мл (контроль) вносят 5 мл субстрата, 25 мл трис-буферного раствора рН 9, перемешивают, закрывают пробкой и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 1 ч. К смеси добавляют 20 мл этанола и количественно пере-

носят с помощью 50 мл этанола, используемого для смыва, в колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 1 мл раствора ферментного препарата, 0,5 мл раствора фенолфталеина и титруют 0,05 М раствором NaOH до появления розовой окраски.

Липолитическую активность (X, ЕД/мг) рассчитывают по формуле:

$$X = (\Delta V \cdot 50 \cdot 100) / g \cdot 60 \cdot 1,$$

где: ΔV — разность объемов раствора NaOH, пошедшего на титрование опытной и контрольной пробы, мл; 50 — количество микромолей NaOH, содержащихся в 1 мл 0,05 М раствора NaOH; 100 — объем испытуемого раствора ферментного препарата первого разведения, мл; 1 — объем испытуемого раствора ферментного препарата взятого из первого разведения, мл; g — навеска ферментного препарата, мг; 60 — время гидролиза 40% эмульсии оливкового масла, мин.

Липолитическая активность 1 мг ферментного препарата липазы, получаемого из поджелудочной железы свиней, составляет не менее 4000 ЕД/мг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОЧИЩЕННОГО КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ТРИПСИНА

Трипсин, выделенный из панкреатического сырья хроматографическими методами, является протеолитическим ферментом, имеет молекулярную массу 23800, оптимум рН 8, изоэлектрическую точку 10,5; E280—1,3 и обеспечивает гидролиз (расщепление) полипептидной цепи белка по С-концам аминокислотных остатков лизина Lys и аргинина Arg. В этом проявляется специфическое действие трипсина. Фермент активируется в присутствии ионов Ca²⁺ и ингибируется диизопропилфторфосфатом и ионами Ag⁺.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

1. 0,46 М Трис-HCl/0,0115 М CaCl₂ буфер рН 8,1. Готовят растворением 55,7 г трис(гидроксиметил)аминометана NH₂C(CH₂OH)₃ и 2,5 г CaCl₂·6H₂O в 0,5 л воды, устанавливают рН раствора равным 8,1, добавляя конц. раствор HCl, и доводят общий объем раствора до 1 л.

2. 0,01 М раствор п-толуолсульфонил-L-аргинина метилового эфира (TAME). Готовят растворением 3,789 г TAME C₁₄H₂₂N₄O₄S·HCl в 1 л дистиллированной воды.

3. 0,001 М раствор HCl.

4. Раствор трипсина. Готовят растворением 10 мкг фермента в 1 мл 0,001 М раствора HCl.

5. Спектрофотометр с кюветами 1 см. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл, пробирки, градуированные пипетки. Холодильник или лед. Воронки с фильтровальной бумагой. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 20–30 °С.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вносят в 2 кюветы по 2,6 мл 0,46 М Трис-HCl/0,0115 М CaCl₂ буфера и 0,3 мл 0,01 М раствора ТАМЕ, инкубируют в термостате при температуре 25 °С в течение 3 мин. Во 2-ю кювету добавляют 0,1 мл 0,001 М раствора HCl (контрольная проба), в 1-ю кювету вносят 0,1 мл раствора фермента и измеряют при 247 нм изменение значения оптической плотности D против контрольной пробы в течение первых 3 мин после внесения раствора фермента.

РАСЧЕТ

Вычисляют значение удельной активности трипсина А (ЕД/мг) по формуле:

$$A, \text{ ЕД/мг} = \Delta D_{247/\text{мин}} \cdot 1000 \cdot 3 / 540 \cdot g,$$

где: $\Delta D_{247/\text{мин}}$ — изменение значения оптической плотности в единицу времени; g — количество трипсина в мг, содержащееся в 0,1 мл пробы взятой в кювету на анализ.

Коммерческие препараты высокоочищенного трипсина имеют, как правило, удельную активность более 170 ЕД/мг по субстрату ТАМЕ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

За единицу коллагенолитической активности принимают такое количество фермента, которое при взаимодействии с N_α-бензоил-D, L-аргинина-п-нитроанилидом (ВАРНА) в течение 30 мин при pH 7,5 и температуре 37 °С увеличивает оптическую плотность раствора на 1,0 при длине волны 410 нм.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Спектрофотометр на 410 нм. Микропипетки на 0,1–10 мл. Весы аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г. Колбы мерные

вместимостью 25, 100 мл. Цилиндры мерные вместимостью 25 и 100 мл. Пробирки вместимостью 10 мл с шлифованными пробками. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 20–40 °С

РЕАКТИВЫ

Стандартный раствор коллагеназы (ГСО). N_α-бензоил-D, L-аргинина-п-нитроанилид (ВАРНА), 1 мг/мл раствор ВАРНА в 0,05 М трис-HCl буферном растворе pH 7,5. Уксусная кислота, 30% раствор. Соляная кислота хч, 0,1 М раствор из фиксанала. Кальция хлорид, хч. Диметилформамид хч. Вода дистиллированная.

ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

0,05 М трис-HCl буферный раствор pH 7,5 готовят в мерной колбе на 100 мл растворением 2,43 г трис(гидроксиметил)аминометана (трис) в 90 мл воды и доводят объем раствора до 100 мл (раствор А). 5 мл полученного раствора А вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 45 мл 0,1 М раствора HCl и доводят объем раствора до 100 мл. В полученном растворе устанавливают pH 7,5 добавлением 0,1 М раствора HCl или раствором А и прибавляют 11,1 г кальция хлорида до растворения. Срок хранения раствора при 7 °С 10 сут.

0,1% раствор ферментного препарата готовят в мерной колбе на 25 мл растворением навески 0,025 г фермента в 20 мл 0,05 М трис-HCl буферного раствора pH 7,5 и доводят объем буфером до 25 мл. Срок хранения раствора при 7 °С 8 ч.

Раствор N_α-бензоил-D, L-аргинина-п-нитроанилида (ВАРНА) готовят в мерной колбе на 25 мл растворением навески 0,025 г ВАРНА в 1 мл диметилформамида и доводят объем раствора субстрата 0,05 М трис-HCl буферным раствором pH 7,5 до 25 мл. Срок хранения раствора ВАРНА при 7 °С 48 ч.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В четыре пробирки вместимостью 10 мл вносят пипеткой по 0,5 мл 1 мг/мл раствора ВАРНА в 0,05 М трис-HCl буферном растворе pH 7,5 и помещают в термостат с температурой 37 °С на 10 мин в пробирки 1 и 2 пипеткой добавляют 0,1 мл 0,1% раствора испытуемого препарата и 0,1 мл стандартного раствора коллагеназы.

Все пробирки перемешивают и выдерживают в термостате при 37 °С в течение 3 мин. Через 30 мин во все четыре пробирки пипет-

кой прибавляют по 1 мл 30% раствора уксусной кислоты, а в пробирки 3 и 4 пипеткой вносят 0,1 мл 0,1% раствора испытуемого препарата и 0,1 мл стандартного раствора коллагеназы ГСО соответственно.

В пробах определяют значение оптической плотности при длине волны 410 нм в слое 1 см. В качестве сравнения используют раствор пробирок 3 и 4.

Коллагенолитическую активность коллагеназы X (ЕД/мг) вычисляют по формуле:

$$X = A_{СТ} \cdot (D_1 / D_2) \cdot (P_2 / P_1),$$

где: D_1 и D_2 — значения оптических плотностей растворов пробирок 1 и 2 соответственно; P_1 и P_2 — разведения 0,1% растворов препарата и коллагеназы соответственно; $A_{СТ}$ — коллагенолитическая активность стандартного образца коллагеназы, ЕД/мг.

Удельная коллагенолитическая активность препарата на мг белка (А, ЕД/мг белка) определяют по формуле:

$$A = X / B,$$

где: B — содержание белка в мг протеина на мг ферментного препарата.

Удельная коллагенолитическая активность ферментного препарата по нормативным требованиям должна быть не менее 20 ЕД/мг белка.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОЛЛАГЕНАЗЫ ПО ОКСИПРОЛИНУ

За единицу коллагенолитической активности принимают такое количество фермента, которое при воздействии на субстрат (коллаген) в условиях опыта в течение 1 мин при температуре 37 °С выделяет 1 мкм оксипролина при 540 нм.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Спектрофотометр на 540 нм. Микропипетки на 0,1–10 мл. Весы аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г. Колбы мерные вместимостью 25, 100 мл. Цилиндры мерные вместимостью 25 и 100 мл. Пробирки вместимостью 10 мл с шлифованными пробками. Термостаты, обеспечивающие поддержание температуры в интервале 0–100 °С и 100–150 °С. Ампулы из термостойкого стекла вместимостью 10–20 мл или пробирка с герметично закручивающейся тefло-

новой пробкой «Пирекс». Стаканчики вместимостью 25 мл. Устройство для фильтрования через бумажный фильтр.

РЕАКТИВЫ

Кислота уксусная ледяная, хч. Натрия ацетат хч. Вода дистиллированная. Тимол крист., чда. Кальция ацетат 0,3 М раствор. Кислота соляная хч, 0,01; 0,1; 6 М раствор. Натрия гидроксид хч, 0,01; 0,1; 6 М раствор. Хлорамин Б. Эфир диэтиловый чда. Пропиловый спирт хч. Этанол, хч. Лимонная кислота хч. п-Диметиламинобензальдегид чда, перекристаллизованный из спирта этилового. Хлорная кислота хч, 42% раствор. Коллаген животный ММ 80 кДа или полученный по методике. Оксипролин хч.

ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

0,1 М ацетатный буфер рН 5,6. Готовят растворением 0,58 мл уксусной кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до 100 мл (раствор А). 1,36 г ацетата натрия растворяют в небольшом количестве воды в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до 100 мл (раствор Б). Смешивают растворы А и Б в соотношении 1:8. Срок хранения раствора при 7 °С составляет 5 сут.

0,3 М раствор кальция ацетата готовят растворением навески 5,28 г ацетата кальция в мерной колбе вместимостью 100 мл в воде и доводят объем раствора до 100 мл. Срок хранения раствора при 7 °С — 5 сут.

Реактив для окисления готовят растворением в мерной колбе вместимостью 25 мл 0,3525 г хлорамина Б в 2,5 мл воды, добавляют 2,5 мл пропилового спирта и доводят объем раствора до 25 мл прибавлением буферной смеси. Буферную смесь готовят растворением в 20 мл воды 5 г лимонной кислоты, 1,2 мл ледяной уксусной кислоты, 12 г натрия ацетата, 3,4 г NaOH, и доводят объем раствора А до метки — 100 мл (рН 6,0). Отдельно смешивают 30 мл пропилового спирта с 20 мл воды, получая раствор Б. Смешивают растворы А и Б в соотношении 2:1. Реактив для окисления готовят перед использованием.

Реактив для проведения цветной реакции готовят суспензированием в мерной колбе вместимостью 25 мл 2,5 г п-диметиламинобензальдегида в 15 мл пропанола, прибавляют 6,5 мл 42%-ного раствора HClO_4 , доводят объем раствора до 25 мл прибавлением пропанола. Реактив для проведения цветной реакции готовят перед использованием.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОЛЛАГЕНА

Парные или свежемороженные ахилловы сухожилия крупного рогатого скота, очищенные от посторонних тканей, гомогенизируют

с 4 объемами воды при 5 °С в течение 2 мин. Выделение коллагена проводят при указанной температуре. Полученную массу экстрагируют (3 × 2 ч) 10 объемами 1% раствора NaCl до отрицательной пробы на растворимые белки в экстрагенте.

Пробу на белок проводят, добавляя к 1 мл раствора 1 мл 10% раствора NaOH и 2 капли 1% раствора CuSO₄, при взбалтывании не должно быть фиолетового окрашивания.

Экстрагированную ткань отделяют, промывают водой на сите до отрицательной реакции на хлориды. Пробу на Cl⁻ проводят, добавляя к 2 мл раствора 10 капель 1% раствора AgNO₃, не должно образовываться осадка хлорида серебра.

Отделенную и промытую массу гомогенизируют с 15 объемами 0,1 М раствора NaOH в течение 2 мин и центрифугируют при 5000 G в течение 15 мин. Массу вновь гомогенизируют с 15 объемами 0,1 М раствора NaOH в течение 2 мин и центрифугируют при 5000 G в течение 15 мин. Надосадочные слои сливают. Осадок суспензируют в 50 объемах воды, pH смеси устанавливают 7,0 добавлением 0,1 М раствора HCl. Образовавшийся осадок отделяют от раствора на сите, промывают водой и гомогенизируют в 100 объемах 0,01 М раствора HCl в течение 3 мин. Гомогенат центрифугируют 5 мин при 3000 G, всплывшую пленку отбрасывают, надосадочную жидкость сливают в охлажденную емкость и медленно по каплям нейтрализуют 0,1 М раствором NaOH до pH 7,0.

Волокнистый осадок коллагена отделяют на сите, промывают 3 раза водой, обезвоживают, перемешивая в этаноле в течение 20 мин, в эфире в течение 10 мин и высушивают на воздухе. Срок хранения коллагена при -10 °С составляет 6 мес.

Содержание оксипролина в коллагене проводят следующим образом. В две ампулы из термостойкого стекла или пробирки Пирекс помещают навески по 10 мг коллагена и прибавляют по 6 мл 6 М раствора HCl. Ампулы запаивают и проводят гидролиз при 100 °С в течение 18 ч. Содержимое ампул количественно переносят в мерные колбы вместимостью 25 мл, нейтрализуют 6 М раствором NaOH до pH 6, доводят объем раствора до 25 мл и фильтруют через бумажный фильтр. Далее содержание оксипролина в коллагене X (% масс.) определяют так, как это описано далее при определении коллагенолитической активности. Расчет проводят по формуле:

$$X = g \cdot 10^{-9} \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 / 0,5 \cdot 0,01(100 - B),$$

где: $g \cdot 10^{-9}$ — количество оксипролина, найденное по калибровочному графику, моль; 0,5 — объем раствора, взятого для цветной реакции, мл; 0,01 — навеска коллагена, г; B — содержание влаги в коллагене,%. Количество оксипролина в коллагене должно быть > 0,1%.

ПОСТРОЕНИЕ ГРАДУИРОВАННОГО ГРАФИКА

Навеску 6,25 мг оксипролина растворяют в мерной колбе в 250 мл воды и получают раствор с содержанием оксипролина $190 \cdot 10^{-3}$ микро-моль/мл. Готовят разведения (табл. 8.2).

К содержимому каждой пробирки прибавляют 1 мл реактива для окисления, перемешивают, выдерживают при комнатной температуре в течение 20 мин, затем во все пробирки вносят по 1 мл реактива для проведения цветной реакции, пробирки закрывают пришлифованными пробками, выдерживают при 60 °С в течение 15 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры проточной водой и измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм против контрольного раствора. Калибровочный график строят, откладывая по оси абсцисс общее количество оксипролина в микромолях, а по оси ординат — соответствующие оптические плотности.

Таблица 8.2

Разведения растворов для определения оксипролина

№№ п/п	Раствор оксипролина, мл	Вода, мл	Содержание оксипролина, мкм·10 ⁻³
1	0,2	1,8	38
2	0,4	1,6	76
3	0,6	1,4	114
4	0,8	1,2	152
5	1,0	1,0	190
6	1,2	0,8	228
7	1,4	0,6	266
9	1,6	0,4	304
Контроль	0	2,0	0

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску фермента в количестве 10 мг растворяют в 10 мл ацетатного буфера.

В две пробирки на 10 мл помещают по 60 мг коллагена, 4 мл раствора ферментного препарата, 1,2 мл раствора ацетата кальция, 0,8 мл ацетатного буфера и несколько кристалликов тимола. Пробирки закрывают пробками и выдерживают при $(37,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ в течение 2 ч.

Остатки коллагена отделяют фильтрованием через бумажные фильтры в пробирки вместимостью 10 мл. По 2 мл фильтрата переносят в ампулы из термостойкого стекла, прибавляют 2 мл концен-

трированной соляной кислоты, ампулы запаивают на газовой горелке и проводят гидролиз при температуре 110 °С в течение 6 ч или при температуре 130 °С в течение 3 ч.

После охлаждения содержимое ампул количественно переносят в стаканчики вместимостью 25 мл, нейтрализуют содержимое 6 М раствором NaOH, до pH 6,0, количественно переносят в мерные колбы вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки, растворы фильтруют через бумажный фильтр.

В две опытные пробирки с притертыми пробками вносят по 2 мл нейтрализованного раствора, а в две контрольные пробирки — по 2 мл воды. Затем во все пробирки прибавляют по 1 мл реактива для окисления, встряхивают смесь при комнатной температуре в течение 20 мин, вносят по 1 мл раствора для проведения цветной реакции, перемешивают и закрывают пробирки стеклянными пробками.

Пробирки выдерживают при температуре (60,0 ± 0,1)°С в течение 15 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры и не позднее, чем в течение 30 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 540 нм в толщине слоя 5 см против контрольного раствора.

РАСЧЕТ

Коллагенолитическую активность коллагеназы в миллиединиц действия X (мЕД/мг) вычисляют по формуле:

$$X = A \cdot 10^{-6} \cdot P / 1000g,$$

где: $A \cdot 10^{-6}$ — количество оксипролина, найденное по градуировочному графику в миллимолях (среднее из двух определений); P — разведение (в условиях опыта $p = 93,75$); g — навеска ферментного препарата, мг.

Разведение оценивают по формуле:

$$X = V_1 \cdot V_3 \cdot V_5 / V_2 \cdot V_4 \cdot V_6,$$

где: V_1 — объем раствора ферментного препарата, мл; V_2 — объем раствора ферментного препарата, взятый для анализа, мл; V_3 — объем раствора препарата взятый для инкубирования с коллагеном, мл; V_4 — объем раствора ферментного препарата, взятый для кислотного гидролиза, мл; V_5 — объем раствора после нейтрализации, мл; V_6 — объем раствора взятый для цветной реакции, мл.

Активность медицинского препарата с коллагенолитической активностью составляет не менее 0,8 миллиЕД/мг.

8.3. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ

В процессе переработки, при хранении и в составе живых организмов, в том числе при переваривании, белки подвергаются гидролитическому распаду на составные части — аминокислоты. Основные аминокислоты, входящие в состав животных белков, являются L-аминокислотами, но в природе аминокислоты проявляют оптическую активность и существуют в виде D, L-рацематов (табл. 8.3). D-аминокислоты встречаются во многих антибиотиках пептидной природы.

Аминокислоты являются элементарными «химическими звеньями», из которых в живом организме «собираются» белковые цепи. Количественный анализ аминокислот характеризует качество всех белок содержащих продуктов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АЗОТА СВОБОДНЫХ АМИНОГРУПП В БЕЛКЕ (АМИННОГО АЗОТА)

При биохимических исследованиях возникает необходимость определять количество азота свободных аминокислот, содержащихся в белках, пептидах или их гидролизатах. Такое определение может быть осуществлено методом формольного потенциометрического титрования (по Зеренсену — Гаврилову) продуктов гидролитического распада белков.

В процессе гидролиза белка при расщеплении пептидных (амидных) связей —NH—CO— образуются свободные амино- и карбоксильные группы.

Метод формольного титрования основан на блокировании формальдегидом в нейтральной среде свободных аминокислот с последующим титрованием карбоксильных групп щелочью. Количество свободных карбоксильных групп эквивалентно количеству свободных аминокислот.

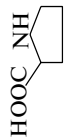
ОБОРУДОВАНИЕ

Лабораторный pH-метр с бюреткой вместимостью 50 мл. Химические стаканы и пипетки.

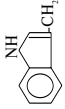
РЕАКТИВЫ

1. 37%-ный раствор формалина.
2. Гидроксид натрия хч, 0,2 М, 0,1 М, 0,05 М водные растворы NaOH.
3. Растворы H₂SO₄: 0,2 н., 0,1 н., 0,05 н.
4. Гидролизат белка или питательная среда.
5. 1% раствор фенолфталеина.

Наиболее распространенные α -аминокислоты (D, L-рацематы)

Русское наименование (+) — незаменимые амино-кислоты	Англ. наименование	Символ		Структурная формула	MM	pI	Растворимость, г/100 г			Тразл., °C
		рус.	англ.				в воде при 20 °C	в воде при 100 °C	в этаноле при 20 °C	
Алифатические аминокислоты										
Глицин	Glycine	Гли	Gly	H_2NCH_2COOH	75,1	5,97	25	67	0,043	292
Аланин	Alanine	Ала	Ala	$H_2NCH(CH_3)COOH$	89,1	6,02	16	37	0,16	297
g	4-ami-nobu-tyric acid	—	GABA	$H_2N(CH_2)_3COOH$	103,1	7,0	10	—	—	205
+Валин	Valine	Вал	Val	$(CH_3)_2CHCH(NH_2)COOH$	117,2	5,97	8	18	0,57	315
+Лей-цин	Leucine	Лей	Leu	$(CH_3)_2CHCH_2CH(NH_2)COOH$	131,2	5,97	2	5	—	337
+Изо-лейцин	Iso-leucine	Иле	Ile	$(CH_3)(C_2H_5)CHCH(NH_2)COOH$	131,2	6,02	4	8	—	284
Циклические аминокислоты										
	Proline	Про	Pro		115,1	6,10	16	23	1,5	222
Окси-пролин	Oxy-proline	Опр	Opp		131,1	5,78	—	—	—	200

Окончание

Русское наименование (+) — незаменимые амино-кислоты	Англ. наименование	Символ		Структурная формула	MM	pI	Растворимость, г/100 г			Тразл., °C
		рус.	англ.				в воде при 20 °C	в воде при 100 °C	в этаноле при 20 °C	
Ароматические аминокислоты										
+Фенил-аланин	Phenyl-alanine	Фен	Phe	$C_6H_5CH_2CH(NH_2)COOH$	165,2	5,88	3	10	—	284
+Трип-тофан	Tryptophane	Трп	Trp		204,6	5,88	1	5	—	282
Тирозин	Tyrosine	Тир	Tyr	$HOOC_6H_4CH_2CH(NH_2)COOH$	181,2	5,65	0,05	0,5	—	344
Серосодержащие аминокислоты										
+Метионин	Methi-onine	Мет	Met	$CH_3S(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$	149,2	5,75	3	17	—	285
Цистеин	Cysteine	Цис	Cys	$SHCH_2CH(NH_2)COOH$	121,3	5,02	—	—	—	178
Цистин	Cystin			Cys-S-S-Cys	240,3	5,06	0,01	0,1	—	260
Аминокислоты карбоновых кислот										
Аспарагиновая кислота	Aspartic acid	Асп	Asp	$HOOCCH_2CH(NH_2)COOH$	133,1	2,87	0,5	7	—	270
Аспарагин	Aspara-gine	Асп	Asn	$H_2NCOCH_2CH(NH_2)COOH$	132,1	5,41	2	55	—	236

Русское наименование (+) — незаменимые амино-кислоты	Англ. наименование	Символ		Структурная формула	ММ	pI	Растворимость, г/100 г			Травл., °С
		рус.	англ.				в воде при 20 °С	в воде при 100 °С	в этаноле при 20 °С	
Глута-минная кислота	Gluta-mic acid	Глу	Glu	<chem>HOOC(CH2)2-CH(NH2)COOH</chem>	147,1	3,22	1	14	—	249
Глутамин	Gluta-mine	Глн	Gln	<chem>H2N(O)C(CH2)2-CH(NH2)COOH</chem>	146,1	5,65	3	—	—	185
Основные аминокислоты										
+Лизин	Lysine	Лиз	Lys	<chem>H2N(CH2)3-CH(NH2)COOH</chem>	146,2	9,74	—	—	—	224
± Аргинин	Argi-nine	Арг	Arg	<chem>H2NC(=NH)NH(CH2)3-CH(NH2)COOH</chem>	174,2	10,7	15	—	—	238
± Гистидин	Histi-dine	Гис	His	<chem>Nc1c[nH]cn1-CH2-CH(NH2)COOH</chem>	155,2	7,58	0,4	—	—	277
Орнитин	Orni-thine	Орн	Orn	<chem>NH2(CH2)3-CH(NH2)COOH</chem>	132,1	5,5	13	—	—	197
Гидроксикилоты										
Серин	Serine	Сер	Ser	<chem>HOCH2-CH(NH2)COOH</chem>	105,1	5,68	5	32	—	228
+Тре-онин	Thre-onine	Тре	Thr	<chem>HOCH(CH3)-CH(NH2)COOH</chem>	119,1	6,53	—	—	—	253

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В химический стакан вносят точно 1 мл анализируемого препарата (питательной среды или гидролизата), затем приливают 10 мл воды. Доводят рН раствора до значения рН 7 потенциометрически, по рН-метру, используя для этого 0,05 М, 0,1 М, 0,2 М растворы гидроксида натрия и серной кислоты (концентрация растворов определяется наличием карбоксильных групп).

В отдельной емкости нейтрализуют примерно 20 мл 37%-ного формалина потенциометрически до значения рН 7.0. Для нейтрализации используют те же растворы NaOH и H₂SO₄.

В химический стакан с препаратом опускают электроды рН-метра, приливают 6 мл свеженейтрализованного формалина. Значение рН при этом сдвигается в кислую сторону из-за освобождения карбоксильных —COOH групп после взаимодействия формалина с аминокислотными группами. Не вынимая электроды из стакана, пробу титруют 0,1 М раствором NaOH при перемешивании до значения рН 9,1.

Параллельно проводят контрольный опыт, где вместо препарата берут 1 мл воды (холостая проба). Титрование проводится потенциометрически.

РАСЧЕТ

Содержание аминного азота X (в граммах аминного азота на 100 мл раствора препарата) рассчитывают по формуле:

$$X = (A - B) \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100 / Y,$$

где: А — количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование пробы, мл; В — количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование контроля (холостой пробы), мл; К — поправка к титру 0,1 М раствора NaOH (К = 1 при использовании точно титрованного 0,1 М раствора NaOH); 1,4 — количество азота (в мг), эквивалентное точно 1 мл пробы; Y — объем пробы, взятой на определение, мл; 100 — пересчет на 100 мл пробы.

Для оценки содержания свободных аминокислотных групп в пептидно-аминокислотных объектах, выраженное в процентах, определение азота свободных аминокислот можно проводить следующим образом. 1 мл анализируемого препарата, содержащего около 35 мг/мл свободных аминокислот, разбавляют смешением с 49 мл дистиллированной воды, прибавляют 10 капель 1%-ного раствора фенолфталеина и титруют 0,1 М раствором гидроксида натрия до появления слабо розовой окраски. После этого прибавляют 10 мл раствора формальдегида, нейтрализуют

ванного по фенолфталеину до обесцвечивания. Затем титруют 0,1 М раствором NaOH до появления розовой окраски.

Раствор формальдегида (формольную смесь) готовят перед проведением анализа смешиванием 50 мл технического формалина с 1 мл 1%-ного раствора фенолфталеина и 0,1 М раствором NaOH доводят окраску смеси до слабо розового окрашивания.

Содержание азота свободных аминокрупп (X,%) рассчитывают по формуле:

$$X = (A - B) \cdot K \cdot 0,0014 \cdot 100 / Y,$$

где: A — количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на первое и второе титрование пробы, мл; B — количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на первое титрование, мл; K — поправка к титру 0,1 М раствора NaOH (K = 1 при использовании точно титрованного 0,1 М раствора NaOH); 0,0014 — количество азота в граммах, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора NaOH; Y — количество испытуемого раствора, взятого при определении, мл; 100 — пересчет на 100%.

Содержание азота для указанной концентрации свободных аминокислот в 30 мг/мл и пептидов составляет от 0,3 до 0,9% (от 3 до 9 мг/мл).

Результат представляют с точностью до десятого знака после запятой.

Ошибка определения составляет $\pm 15\%$ определяемой величины.

АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Индивидуальные аминокислоты в растворе или в смесях могут быть разделены методом тонкослойной хроматографии. Метод основан на различной растворимости отдельных аминокислот в двух частично смешивающихся жидкостях, одной из которых является вода, другой — водонасыщенный органический растворитель, например смесь бутанола с уксусной кислотой. Водная фаза является неподвижной, так как вода в данном случае оказывается сорбированной на инертном носителе — бумажной целлюлозе, которая в закрытой хроматографической камере в насыщенной влажной атмосфере удерживает до 20% воды. Подвижной фазой является насыщенный водой органический растворитель.

В зависимости от растворимости аминокислоты в воде или органическом растворителе наблюдается разная скорость движения аминокислот при смачивании бумаги с нанесенным на нее для анализа

образцом. Для усиления видимости пятен, соответствующих аминокислотам, хроматограмму «проявляют», то есть обрабатывают веществом, окрашивающим пятна. Наиболее часто для этих целей применяют нингидрин.

Типичная хроматограмма после окрашивания представляет собой полоску бумаги, на которой слабо просматривается стартовое пятно и хорошо видны пятна индивидуальных аминокислот, которые располагаются выше старта.

Местоположение вещества на хроматограмме зависит от коэффициента распределения α : $\alpha = [\text{концентрация вещества в подвижной фазе}] / [\text{концентрация вещества в неподвижной фазе}]$.

Для характеристики положения пятна с веществом применяют величину R_f — коэффициент скорости движения (retention factor — фактор удерживания): $R_f = [\text{расстояние, пройденное аминокислотой от старта, мм}] / [\text{расстояние, пройденное фронтом растворителя от старта, мм}]$.

R_f является характерной постоянной для данного вещества и зависит от качества применяемого растворителя, его состава, pH, температуры, плотности бумаги и других факторов. Если указаны условия определения и значение R_f , то можно точно указать, о каком веществе идет речь (табл. 8.4).

Метод является простым и широко используется для определения аминокислот и других органических веществ в количествах от десятых до сотых долей миллиграмма.

Чувствительность метода 2–5 мкг индивидуального вещества в одном пятне.

ОБОРУДОВАНИЕ

Пинцет, хроматографическая камера, бумага для хроматографии или хроматографические пластинки типа Silufol, стеклянный капилляр, ножницы, сушильный шкаф на 70 °С, пульверизатор.

РЕАКТИВЫ

Бутиловый спирт хч или чда, уксусная кислота ледяная х.ч., вода дистиллированная (готовят заранее смесь для хроматографирования), 0,5%-ный раствор в ацетоне, смесь аминокислот: например, глутаминовая кислота — 60 мг, аланин — 40 мг, глицин — 40 мг, растворенные в 10 мл дистиллированной воды (можно использовать раствор смеси по 50 мг других аминокислот в 10 мл воды).

ХОД РАБОТЫ

Вырезают полоску хроматографической бумаги длиной в 15 см и шириной в 1,5 см. Можно использовать специальные пластинки Silufol или Merck для тонкослойной хроматографии. Размеры вырезаемой полоски должны соответствовать размерам хроматографической камеры.

Приготавливают хроматографическую камеру, которая представляет собой большую пробирку с пробкой, цилиндр с притертой крышкой или специальную прямоугольную стеклянную камеру, герметично закрываемую сверху притертым стеклом. На дно камеры заливают 2 мл смеси бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:5 и закрывают крышкой.

На полоске бумаги карандашом ставят черточку примерно в 2 см от нижнего края и капилляром наносят касанием 1 каплю испытуемой смеси.

Пластинке дают подсохнуть над горячей поверхностью плитки или сушильного шкафа и повторяют процедуру касания капилляром 3 раза. Место нанесения пробы не должно соприкоснуться с растворителем при помещении полоски бумаги в хроматографическую камеру (карандашная полоска должна быть на 0,5 см выше слоя растворителя).

Пинцетом опускают вертикально в камеру полоску бумаги нижним краем в растворитель и закрывают камеру. Процесс хроматографирования проводят в течение 1–2 ч. При этом происходит продвижение вверх фронта растворителей и разделение аминокислот. Хроматограмму извлекают из камеры, отмечают границу продвижения фронта растворителя (карандашом или надрезанием края бумаги) и высушивают под тягой.

На высушенную хроматограмму наносят пульверизатором или осторожным смачиванием путем погружения 0,5%-й раствор нингидрина в ацетоне и подсушивают на воздухе. При смачивании не допускать подтеков.

Проявление хроматограммы проводят, нагревая полоску бумаги в сушильном шкафу при температуре 70 °С в течение 15 мин.

Идентификацию аминокислот осуществляют по найденным значениям R_f . Для этого линейкой измеряют расстояния пробега фронта растворителя и каждого отдельного пятна соответствующей аминокислоты от места нанесения пробы, выраженные в мм. Определяют коэффициент пробега и фактор разделения R_f , значения которых сравнивают с табличными данными.

Таблица 8.4

Значения R_f аминокислот в системе растворителей бутанол: уксусная кислота: вода 4:1:5 (при температуре 20 °С)

Аминокислота	Обозначение аминокислотного остатка	R_f
Цистин	Cys	0,04
Цистеин		0,05
Лизин	Lys	0,14
Гистидин	His	0,16
Аргинин	Arg	0,18
Серин	Ser	0,22
Аспарагиновая кислота	Asp	0,24
Глицин	Gln	0,25
Глутаминовая кислота	Glu	0,28
Треонин	Thr	0,29
Аланин	Ala	0,36
Тирозин	Tyr	0,45
Валин	Val	0,50
Метионин	Met	0,50
Фенилаланин	Phe	0,66
Изолейцин	Ile	0,68
Лейцин	Leu	0,69

По значениям R_f проводят точную идентификацию наличия конкретных аминокислот в анализируемой смеси.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ АНАЛИЗ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ В БЕЛКЕ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВТОМАТИЧЕСКОГО АМИНОКИСЛОТНОГО АНАЛИЗАТОРА

ОБОРУДОВАНИЕ

Анализатор аминокислот LC3000 с компьютером фирмы Eppendorf-Biotronic (Германия) или другой прибор подобного класса с автоматическим термостатируемым устройством ввода пробы и баллоном со сжатым He или N₂ квалификации «ОСЧ для хроматографии». Пластиковые пробирки для проб вместимостью 0,5 мл. Устройство в виде фильтра «in line», надеваемого на шприц, или воронка с колбой для вакуумного фильтрования растворов через фторопластовый

фильтр с номинальным размером пор 0,22 мкм производства Millipore (США). Автоматические пипетки на 10–1000 мкл для разбавления проб. рН-метр с точностью определения $\pm 0,001$ единицы рН в интервале рН 1–14. Установка для кислотного гидролиза белков, представляющая собой термостат на 120 °С, в который помещают запаиваемые на газовой горелке стеклянные ампулы или толстостенные пробирки «Rigex» (США) с плотно завинчивающимися тefлоновыми пробками, удерживающими давление паров HCl. Аналитические весы типа «Sartorius» (Германия) с точностью взвешивания $\pm 0,00001$ г. Устройство для заполнения ампул инертным газом, представляющее собой баллон с Ag с редуктором и барбатажной трубкой или то же с устройством для вакуумирования и заполнения Ag замороженных при -70 °С ампул. Роторный испаритель типа Rotavapor R-144, «Buchi» (Швейцария) с вакуумным насосом для отгонки водных растворов HCl. Центрифуга 8000 G. Измельчитель белковых проб, ступка, стаканы, колбы, пробирки.

РЕАКТИВЫ

Этиловый спирт, хлороформ, соляная кислота 6 М раствор и концентрированная, о-фосфорная кислота, вода бидистиллированная (безаминокислотная для хроматографии), цитрат натрия, тиодигликоль, каприловая кислота, трихлоруксусная кислота, ацетат натрия, метанол, муравьиная кислота, уксусная кислота, борная кислота, этилендиаминтетраацетата динатриевая соль, гидроксид натрия, вода для HPLC, нингидрин, гидридантингидрат, метилцеллозольв. Все реактивы только квалификации «х.ч.», «осч» или «для хроматографии». Стандартный раствор, содержащий по 2,5 мкМоль/мл ASP, THR, GLU, PRO, GLY, ALA, CYS, VAL, MET, ILEY, LEY, TYR, PHE, HIS, LYS и ARG.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Анализ содержания аминокислот выполняют на аминокислотном анализаторе типа LC3000 фирмы Eppendorf-Biotronic (Германия). Для разделения аминокислот используют буферную систему в соответствии с нормативной документацией, приложенной к анализатору, рекомендуемый состав компонентов буферных растворов указан в табл. 8.5. рН буферных растворов устанавливают с помощью ортофосфорной кислоты и гидроокиси натрия, растворы перед введением в анализатор подвергают фильтрованию через фторопластовый фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Принцип определения аминокислот заключается в следующем. 20 мкл анализируемой пробы помещают в пластиковый сосуд, который устанавливают в поворачивающийся штатив автоматического термостатированного инжектора. Закол пробы осуществляется в соответствии с программой после промывки и регенерации хроматографической колонки, имеющей температуру 47 °С и заполненной ионообменником, катионитом марки ВТХ–С с карбоксильными ионогенными группами в Na⁺-форме. Подача элюента осуществляется по капиллярным шлангам высокого давления с внутренним диаметром 0,2 мм. Разделение аминокислот осуществляется автоматически в соответствии с заданной программой. После разделительной колонки раствор поступает в термостатированный реактор для проведения цветной реакции. Подача в реактор нингидринового раствора, содержащего: 15 г/л нингидрина, 0,55 г/л гидридантингидрата, 1% метилцеллозольва, 10% метанола в 0,1М ацетатном буфере рН 4,8, позволяет при температуре реактора 125 °С осуществлять цветную реакцию анализируемых и прошедших аминокислот с нингидрином. Далее окрашенный раствор с комплексом аминокислот с нингидрином подается насосом в УФ детектор. Запись хроматограмм, после введения в хроматограф автосамплером или микрошприцем 20 мкл пробы осуществляют автоматически в соответствии с инструкцией по эксплуатации аминокислотного анализатора. Регистрацию аминокислот, связанных в комплексе с нингидрином, осуществляют автоматически при 570 нм, пролин и оксипролин анализируют соответственно при 440 нм.

Работа анализатора выполняется по программе, предусматривающей ступенчатое изменение вида буфера и температуры хроматографической колонки на каждой стадии. Стандартное время анализа от момента ввода пробы до завершения выхода последнего пика, соответствующего аргинину, составляет 50 минут при скорости подачи элюента 0,22 мл/мин. Основные параметры программы анализа аминокислот приведены в табл. 8.5.

Используемый метод позволяет определять с точностью $\pm(5-10)\%$ наличие до 17 аминокислот с минимальным уровнем их содержания в растворе ($0,500 \pm 0,006$) мкмоль/мл. Минимальный интервал надежного определения сигнала аминокислот, составляющий > 200 мВ, получают для концентрации $> 0,3$ мкг/мл взятого на анализ белка в пробе.

Полный аминокислотный состав белков определяют в гидролизате, полученном по стандартной методике обработкой 6 М раствором HCl при температуре 120 °С в течение 24 ч в токе Ag с последующей трехкратной отгонкой летучих компонентов досуха и окончательным растворением пробы в буфере с рН 2,2, содержащем: цитрата натрия

9,8 г, концентрированной HCl 8,3 мл, тиодигликоля 1 мл и каприловой кислоты 50 мкл на литр.

Свободные аминокислоты определяют в продукте после его обработки добавлением 10% об. трихлоруксусной кислоты для осаждения белков, нейтрализацией до pH 2,0, фильтрацией через мембранный фильтр типа Миллипор с номинальным диаметром пор 0,22 мкм с последующим разбавлением фильтрата в буфере для растворения проб pH 2,2.

Количественную оценку содержания отдельных аминокислот проводят путем сравнения площадей пиков на аминокрамме, рассчитанных с помощью интегрирующих систем, например Winpeak фирмы Erpendorf-Biotronic (Германия) или другой аналогичного уровня, с площадями пиков, полученных при анализе стандартной смеси аминокислот, содержащей например 2,5 мкмоль каждой аминокислоты в 1 мл стандартного раствора.

Содержание аминокислоты (X) в мкМ/мл (или в мг/мл,%, условных машинных единицах или мм по высоте пиков в соответствии с заданной автоматической программой компьютерного обсчета хроматограмм) осуществляют автоматически по формуле:

$$X = S_1/S_2 \cdot C,$$

где S_1 — площадь пика определяемой аминокислоты на аминокрамме; S_2 — площадь пика той же аминокислоты в стандартной смеси; C — концентрация аминокислоты в стандартной смеси, мкМ/мл.

Таблица 8.5

Состав буферных растворов (А–F) для аминокислотного анализатора

Наименование	А	В	С	Д	Е
pH	3,3	3,6	4,5	11,0	11,0
Нормальность	0,10	0,10	0,10	0,25	0,3
Ацетат натрия, г	8,2	8,2	8,2	8,2	0
Метанол, мл	75	0	0	0	0
Муравьиная кислота, мл	3,0	3,0	2,0	1,2	0
Уксусная кислота, мл	15,0	20,0	1,5	5,0	0
Борная кислота, г	0	0	0	2,0	0
Этилендиаминтетраацетата динатриевая соль, г	0	0	0	0,5	0
Гидроокись натрия, г	0	0	0	6,0	12,0
Каприловая кислота, мкл	100	100	100	100	100
Вода HPLC, л	до 1	до 1	до 1	до 1	до 1

Результаты определения рассчитывают до второго десятичного знака, и округляют до первого десятичного знака после запятой.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Точность определения в параллельных опытах по отдельным аминокислотам составляет от ± 10 до $\pm 20\%$, воспроизводимость в независимых определениях составляет от ± 20 до $\pm 40\%$. Для Трп, Про, Цис и Мет воспроизводимость в независимых определениях составляет от ± 40 до $\pm 65\%$.

Типичный аминокислотный состав животного белка может быть записан в (г/100г белка): TAU — 0,2, ASP — 9,2, THR — 3,5, SER — 3,6, GLU — 19,6, PRO — 3,7, GLY — 6,0, ALA — 5,2, CYS — 1,1, VAL — 4,9, MET — 1,9, ILEY — 3,6, LEY — 6,2, TYR — 3,9, PHE — 3,7, HIS — 3,8, OPN — 0,1, LYS — 7,5, ARG — 7,7 (всего 95,4 г/100г белка). Запись в скобках показывает реально получаемую степень гидролиза белка, которая теоретически может составлять до 118% (масс.) за счет присоединения воды при разрыве пептидных связей.

Аминокислотный состав некоторых объектов представлены в табл. 8.6.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Проводят по следующей методике. 5 г образца мяса или рыбы последовательно растирают в ступке с 50, 25 и 15 мл 96%-ного этанола, разделяя осадок и надосадочную жидкость на центрифуге (6000 об/мин, 15 мин, G = 60).

Таблица 8.6

Аминокислотный состав различных продуктов, г/100 г белка

Аминокислота	Мука рыбная	Мясо- костная (30%) смесь	Соя	Альбу- мин яиц	Мякоть сви- нины	Мякоть говя- дины	Хлеб белый пшенич- ный
Незаменимые, в т.ч.	26,58	20,74	35,9	53,9	48,61	50,0	25,77
ИЛЕ	1,94	1,85	4,85	6,9	4,66	4,93	2,69
ЛЕЙ	6,63	4,20	6,98	8,2	8,41	8,57	5,56
ЛИЗ	8,10	4,28	5,70	7,6	10,3	10,65	1,50
МЕТ	0,81	0,30	1,21	4,8	3,21	3,35	0,83
ЦИС	0,27	0,11	1,61	1,9	1,12	1,18	1,85
ФЕН	1,01	2,60	4,47	4,8	4,62	4,55	4,07
ТИР	1,12	1,30	2,89	5,8	3,77	3,98	2,19
ТРЕ	2,63	2,40	2,18	7,0	5,81	5,91	2,35
ТРП	0	0	1,25	2,0	1,24	1,32	1,13

Окончание

Аминокислота	Мука рыбная	Мясо- костная (30%) смесь	Соя	Альбу- мин яиц	Мякоть сви- нины	Мякоть говя- дины	Хлеб белый пшенич- ный
ВАЛ	4,07	3,70	4,76	4,9	5,47	5,56	3,60
Заменимые, в т.ч.	64,51	62,74	55,65	54,7	46,15	46,2	59,1
АЛА	6,39	7,90	3,71	6,7	3,41	3,63	3,04
АРГ	2,25	6,66	6,53	5,7	7,32	7,80	3,08
АСП	11,47	6,52	10,95	9,3	7,75	7,98	3,48
ГАМА	—	—	0	—	—	—	
ГИС	1,47	2,57	2,15	2,4	3,32	3,46	2,39
ГЛИ	11,74	15,81	3,76	3,1	3,26	2,24	3,93
ГЛУ	21,81	10,44	16,58	16,5	15,9	16,4	29,25
ПРО	5,89	9,63	6,08	5,1	3,17	3,10	10,04
СЕР	3,49	3,21	5,89	5,9	2,02	1,59	3,89
СУММА	91,09	83,48	91,56	108,6	94,76	96,2	84,87
Е/Т,%*	29,1	24,8	39,2	49,5	51,3	51,9	30,4
МЕТ/ИЛЕ	0,40	0,16	0,25	0,70	0,68	0,68	0,31
Белок,%	42,1	22,70	34,5	12,5	16,8	18,1	9,8

* Е/Т — соотношение заменимых аминокислот к общему количеству содержащихся в белке аминокислот.

Экстракцию растертого образца повторяют последовательно 80% и 50% водным этанолом. Отделенные центрифугированием водно-спиртовые экстракты от всех экстракций объединяют и подвергают троекратному экстрагированию (1: 5) хлороформом. Хлороформный слой, содержащий спирт, отбрасывают. Водную вытяжку упаривают в вакууме на ротаторном испарителе, типа системы Rotavapor R-144, «Vuchi» (Швейцария) досуха. К сухому остатку добавляют 60 мл цитратного буфера рН 2,2 для последующего автоматического аминокислотного анализа по программе (табл. 8.7), который проводят аналогично описанному выше.

Содержание аминокислоты (X) в мкМ/мл (в мг/мл или в% в соответствии с заданной автоматической программой компьютерного об-счета хроматограмм) осуществляют автоматически по формуле:

$$X = S_1/S_2 \cdot C,$$

где: S₁ — площадь пика определяемой аминокислоты на аминокрамме; S₂ — площадь пика той же аминокислоты в стандартной смеси; C — концентрация аминокислоты в стандартной смеси, мкМ/мл.

Результаты определения (табл. 8.8) рассчитывают до второго десятичного знака, и округляют до первого десятичного знака после запятой.

Таблица 8.7

Программа анализа содержания аминокислот (давление в колонке 50–60 бар, поток 0,22 мл/мин)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Время, мин	12,0	5,5	7,5	9,0	3,0	11,0	9,0	8,0	0,1	8,0	4,0	6,1	0,4
Ввод образца		X											
Нингидри-новый буфер	X	X	X	X	X	X	X	X					
Буфер А	X	X									X	X	X
Буфер В			X										
Буфер С				X	X								
Буфер D						X	X	X					
Буфер F									X	X			
Температура колонки, °С	47	47	48	48	49	52	56	60	60	70	70	55	55

Таблица 8.8

Содержание свободных аминокислот и полный аминокислотный состав некоторых пищевых продуктов

№№ п/п	Амино- кислота	Время выхода пика амино- кислоты	Свободные аминокислоты			Полный аминокислотный состав		
			Пиво, мг/л	Квас, мг/л	Говядина, мг/100 г продукта	Говядина, г/100 г продукта	Квас, мг/л	Альбумин яиц, г/100 г продукта
1	TAU	6,0	5,4	4,4	14,9	0,1	5,3	—
2	ASP	9,1	45,5	7,9	11,2	2,29	77,1	9,3
3	THR	12,1	8,2	1,8	14,0	0,81	2,9	7,0
4	SER	13,1	19,4	4,4	16,5	0,93	22,4	5,9
5	GLU	14,6	165,8	32,2	2,4	3,28	190,6	16,5
6	PRO	18,0	391,0	28,0	6,9	0,61	100,4	5,1
7	GLY	23,1	74,5	10,7	12,0	0,84	50,9	3,1
8	ALA	23,9	159,3	9,9	52,1	1,44	41,4	6,7
9	CYS	26,1	2,0	1,0	2,3	0,3	4,6	1,9
10	VAL	26,8	157,8	7,8	17,9	1,12	33,4	4,9
11	MET	28,6	21,2	33,2	6,3	0,53	64,3	4,5
12	ILEY	29,9	61,7	9,7	13,7	0,91	24,8	7,0
13	LEY	30,9	132,9	16,9	27,9	1,54	40,8	8,2
14	TYR	34,4	52,0	13,0	12,8	0,88	24,7	5,8
15	GABA	35,9	134,6	5,6	—	—	7,7	—

№№ п/п	Амино- кислота	Время выхода пика амино- кислоты	Свободные аминокислоты			Полный аминокислотный состав		
			Пиво, мг/л	Квас, мг/л	Говядина, мг/100 г продукта	Говядина, г/100 г продукта	Квас, мг/л	Альбумин яиц, г/100 г продукта
16	PHE	36,2	164,3	28,5	14,9	0,79	53,3	4,8
17	HIS	42,1	128,6	24,0	5,2	0,61	38,4	2,4
18	ORN	43,2	10,7	2,7	—	—	3,5	—
19	LYS	45,1	9,5	2,5	19,5	1,66	29,4	7,6
20	ARG	50,6	40,8	3,8	11,7	1,15	15,9	5,7
ИТОГО:			1785,2	248,2	368,4	19,79	831,8	108,4
21	NH ₄ ⁺	48,6	98,6	41,6	51,3	—	180,1	—

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Точность определения в параллельных опытах по отдельным аминокислотам составляет от ± 10 до $\pm 20\%$, воспроизводимость в независимых определениях составляет от ± 20 до $\pm 40\%$. Для Трп, Про, Цис и Мет воспроизводимость в независимых определениях составляет от ± 40 до $\pm 65\%$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТРИПТОФАНА

Триптофан является незаменимой аминокислотой. Уровень содержания Трп в продуктах животного, растительного или рыбного происхождения колеблется в пределах 0,01–0,5 г на 100 г массы (в среднем — около 0,2% масс. для объектов животного происхождения с содержанием белка в 20%).

Учитывая, что триптофан является достаточно неустойчивым органическим соединением и, в случае проведения полного кислотного гидролиза белков в присутствии 6 М HCl по стандартной методике подвергается существенному разложению, целесообразно использовать для его количественного определения метод щелочного гидролиза.

МЕТОД АНАЛИЗА триптофана щелочным гидролизом основан на обработке объекта щелочью с последующим проведением цветной реакции с п-диметиламинобензальдегидом и измерении развивающейся окраски на спектрофотометре при 610 нм. Чувствительность метода составляет около 1 мкг/мл, диапазон измеряемых концентраций 2–8 мкг/мл. Щелочной гидролизат может быть проанализирован по стандартной программе на аминокислотном анализаторе.

ОБОРУДОВАНИЕ

Колба с обратным холодильником для гидролиза вместимостью 100 мл, спектрофотометр или фотометр с $\lambda = 610$ нм с кюветами 1 см, мерные колбы вместимостью 50 и 100 см³, мерные пипетки. рН-метр.

Аминокислотный анализатор типа LC3000 фирмы Eppendorf-Biotronic (Германия). Ампулы для гидролиза или герметизируемые пробирки Пирекс. Термостат на 110 °С.

РЕАКТИВЫ

3 М раствор NaOH. 6 М и 1 М раствор H₂SO₄. 2%-ный раствор NaNO₃. Концентрированная HCl хч. 50%-ный водный этанол. Триптофан химически чистый с содержанием основного вещества не менее 95%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИПТОФАНА ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИЕЙ

До начала определения Трп в образцах с высоким содержанием жиров, необходимо провести их обезжиривание экстракцией диэтиловым эфиром или ацетоном в аппарате Сокслета.

Навеску образца, содержащего из расчета 100–250 мг белка (при содержании белка в образце 5% навеска составляет 2 г), смешивают в колбе для гидролиза с 4 мл дистиллированной воды и 20 мл 3 М раствора NaOH.

Содержимое кипятят в течение 2 ч от начала кипения в колбе с обратным холодильником.

Гидролизат нейтрализуют добавлением в начале 6 М раствора H₂SO₄ и в конце 1 М раствора H₂SO₄ до рН 6,5–7,0 количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор фильтруют, если необходимо дважды, от образовавшегося после гидролиза осадка кремниевой кислоты.

Таблица 8.9

Разбавление стандартного раствора триптофана

V стандартного раствора, мл	V воды, мл	Получаемое содержание Трп, мкг/мл
0,1	0,9	1
0,2	0,8	2
0,3	0,7	3
0,4	0,6	4
0,5	0,5	5
0,6	0,4	6

Для проведения цветной реакции в колбе вместимостью 100 см³ смешивают 1 мл нейтрализованного прозрачного гидролизата с 0,5 мл 2,5%-ного раствора п-диметиламинобензальдегида в 10%-ном растворе HCl или H₂SO₄ при очень энергичном встряхивании, добавляют 0,2 мл 2%-ного раствора NaNO₃, перемешивают и осторожно добавляют 28 мл концентрированной HCl и оставляют при комнатной температуре в течение 30 мин для развития окраски. Доводят объем раствора до метки 50%-ным этанолом.

Параллельно проводят холостой опыт, заменяя гидролизат 1 мл дистиллированной водой. Интенсивность синей окраски измеряют на фотометре при длине волны 610 нм в кювете толщиной 10 мм.

По величине оптической плотности на градуировочном графике зависимости оптической плотности от концентрации Трп, находят концентрацию Трп в объеме жидкости, взятой для цветной реакции (рис. 8.3).

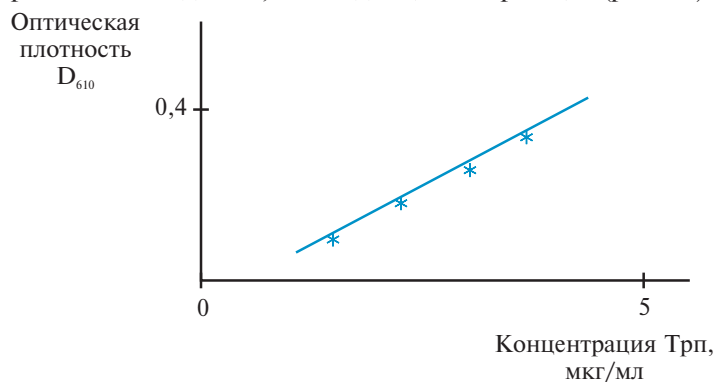


Рис. 8.3. Зависимость оптической плотности D₆₁₀ окрашенного комплекса с п-диметиламинобензальдегидом от содержания Трп в растворе.

Для построения градуировочного графика навеску 50 мг стандартного образца химически чистого Трп растворяют в 20 мл 3 М раствора NaOH и полученный раствор обрабатывают по всем описанным стадиям до проведения цветной реакции, получая раствор с содержанием Трп — 1 мг/мл. После этого готовят не менее 5 стандартных растворов с содержанием Трп 1–6 мкг/мл в соответствии с табл. 8.9 разбавления.

Массовое содержание Трп X в% вычисляют:

$$X = m_1 \cdot 50 \cdot 10^{-6} \cdot 100 / V \cdot g,$$

где: m₁ — масса Трп в исследуемом растворе, найденная по градуировочному графику, мкг; 50 — объем раствора после нейтрализации и разведения, мл; 10⁻⁶ — коэффициент перевода мкг в г; 100 — коэффициент перевода в процентную концентрацию; V — объем раствора, взятый для цветной реакции, мл; g — навеска образца, взятого на анализ, г.

Результаты определения рассчитывают до второго десятичного знака, и округляют до первого десятичного знака после запятой.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Точность определения в параллельных опытах ±20%, воспроизводимость в независимых определениях ±60%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИПТОФАНА НА АМИНОКИСЛОТНОМ АНАЛИЗАТОРЕ

Навеску обезжиренного образца, содержащую около 30 мг белка, помещают в ампулу для гидролиза (можно использовать герметизируемые пробирки Пирекс с завинчивающимися тефлоновыми пробками), добавляют 10 мл 2 М раствора NaOH. Ампулу запаивают и помещают в термостат с температурой (110 ± 2)°C и выдерживают в течение 12 ч, периодически встряхивая.

Гидролизат количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³, смывая ампулу дистиллированной водой, добавляют 10 мл раствора, содержащего 1,23 г лимонной кислоты и 0,7 мл концентрированной HCl и доводят объем до метки. Аликвоту полученного раствора используют в автоматическом анализе на аминокислотном анализаторе, разбавляя, в случае необходимости, цитратным буфером с pH 2,2, используемым в стандартном аминокислотном анализе до концентрации по белку 0,0003 мг/мл. Величина сигнала детектирования при такой концентрации составляет 50–100 мВ на анализаторе типа LC3000 фирмы Eppendorf-Biotronic (Германия).

Массовую долю аминокислоты X в мг на 100 г образца, взятого на гидролиз, определяют по автоматической программе расчета хроматографических данных или по формуле:

$$X = m \cdot P \cdot 10^{-6} \cdot 100 / V \cdot g,$$

где m — массовая доля аминокислоты в объеме вводимой пробы, нг; P — общее разведение с учетом аликвоты; 10⁻⁶ — коэффициент перевода нг в мг; 100 — коэффициент перевода в процентную концентрацию; V — объем вводимой пробы, мл; g — навеска образца, взятого на гидролиз, г.

Результаты определения рассчитывают до второго десятичного знака, и округляют до первого десятичного знака после запятой.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов трех параллельных определений. Точность определения в параллельных опытах ±15%, воспроизводимость в независимых определениях ±30%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОКСИПРОЛИНА

МЕТОД ОСНОВАН на получении свободного оксипролина в растворе в результате кислотного гидролиза пробы с последующим проведением цветной реакции с п-диметиламинобензальдегидом и измерения интенсивности развивающейся окраски.

Чувствительность метода 5 мкг/мл. Диапазон измеряемой концентрации в исследуемом растворе 5–25 мкг/мл.

ОБОРУДОВАНИЕ

Ампулы для гидролиза или герметизируемые пробирки Пирекс. Термостат на 120 °С. Спектрофотометр или фотометр с $\lambda = 560$ нм с кюветами 1 см. Мерные колбы вместимостью 50 и 100 см³. Мерные пипетки. рН-метр. Пробирки.

РЕАКТИВЫ

Гидроксид натрия хч, 6 М и 2,5 М растворы. 4% свежеприготовленный раствор Н₂О₂. Мочевина чда, 0,1 М раствор. Концентрированная НСl, хч. Сульфат меди (II) хч, 0,5 М раствор CuSO₄ · 5Н₂О. Серная кислота хч, 4 М раствор Н₂SO₄. 5%-ный раствор перекристаллизованного п-диметиламинобензальдегида в изопропанол. Оксипролин химически чистый с содержанием основного вещества не менее 95%.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

В ампулу вносят навеску обезжиренного образца из расчета 0,4 г белка (при содержании в образце белка 10% навеска составляет 4 г), добавляют 7 мл дистиллированной воды, 0,7 г SnCl₂ · 2Н₂О и 10 мл концентрированной соляной кислоты. Ампулу запаивают и выдерживают в термостате при температуре 120 ± 2 °С в течение 6 ч.

Содержимое ампулы переносят количественно в мерную колбу вместимостью 100 см³, раствор нейтрализуют добавлением 6 М раствора NaOH до образования белого осадка и 2,5 М раствором NaOH до рН 8,2. Охлажденное до 20 °С содержимое колбы доводят до метки и оставляют на 16 ч. Раствор фильтруют, из фильтрата параллельно отбирают две пробы в количестве по 1 мл. Одновременно в две другие пробирки помещают по 1 мл воды (контроль). В каждую из четырех пробирок последовательно прибавляют по 0,5 мл 0,5 М раствора сернокислой меди, 0,5 мл 2,5 М раствора NaOH и 0,2 мл 4%-ного раствора Н₂О₂, пробирки встряхивают и в течение 10 мин выдерживают при

70 °С, периодически перемешивая. Растворы охлаждают и добавляют к ним 0,1 мл 0,1 М раствора мочевины. Содержимое пробирок перемешивают и через 10 мин добавляют 0,5 мл 4 М раствора Н₂SO₄ и 2,5 мл 5%-ного раствора перекристаллизованного п-диметиламинобензальдегида в изопропанол. Пробирки термостатируют при 70 °С в течение 20 мин и после охлаждения определяют оптическую плотность растворов при длине волны 560 нм в кювете толщиной 10 мм против контроля.

По величине оптической плотности на градуировочном графике зависимости оптической плотности от концентрации оксипролина, находят концентрацию Опр в объеме жидкости, взятой для цветной реакции.

Для построения градуировочного графика (рис. 8.4) готовят раствор стандартного образца химически чистого оксипролина с содержанием Опр — 1 мг/мл. После этого готовят не менее 5 стандартных растворов с содержанием Опр: 5, 10, 15, 20 и 30 мкг/мл. Для этого в мерные колбы вместимостью 50 см³ вносят по 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 основного стандартного раствора с концентрацией 1 мг/мл соответственно и доводят объемы до метки. Берут аликвоту в 1 мл каждого рабочего стандартного раствора и проводят цветную реакцию как указано выше.

Измеряют значения оптических плотностей против контроля и строят градуировочный график.

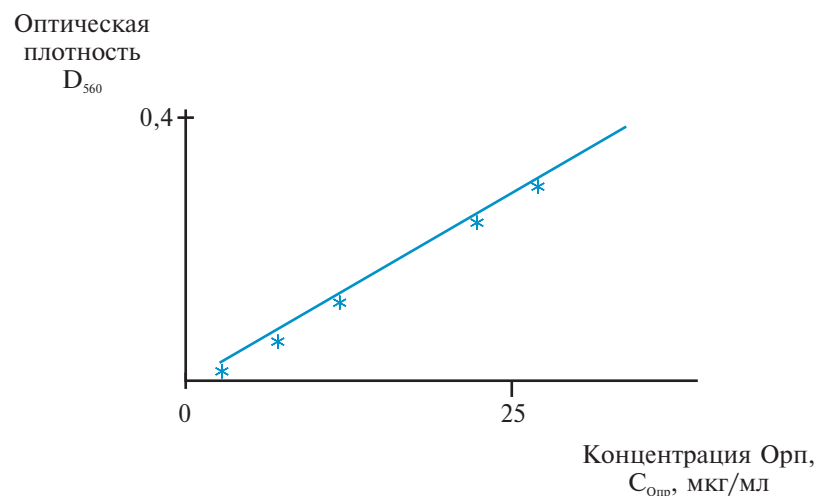


Рис. 8.4. Зависимость оптической плотности окрашенного комплекса с п-диметиламинобензальдегидом от содержания оксипролина в растворе

РАСЧЕТ

Содержание Опр (X,%) вычисляют:

$$X = m_1 \cdot 100 \cdot 10^{-6} \cdot 100 / V \cdot g,$$

где: m_1 — масса Опр в исследуемом растворе, найденная по градуировочному графику, мкг; 100 — объём колбы для разведения, мл; 10^{-6} — коэффициент перевода мкг в г; 100 — коэффициент перевода в процентную концентрацию; V — объём раствора, взятый для цветной реакции, мл; g — навеска образца, взятого на анализ, г.

Результаты определения рассчитывают до второго десятичного знака, и округляют до первого десятичного знака после запятой.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Точность определения в параллельных опытах $\pm 15\%$, воспроизводимость в независимых определениях $\pm 40\%$.

8.4. АНАЛИЗ ЖИРОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Липиды образуют обширную группу поликомпонентных органических соединений этерифицированного глицерина, которые содержатся во всех живых объектах животного, растительного и микробного происхождения.

Липиды — биологически активные вещества, являющиеся производными высших жирных кислот, спиртов и альдегидов и вместе с белками и углеводами составляют основную массу органических веществ живой клетки.

Липиды являются составной частью многих видов пищевого сырья и готовых продуктов. Широко применяются в виде жировых композиций для получения высококалорийных продуктов питания. Липиды содержатся в мясе сельскохозяйственных животных в количестве от 3% (молодняк) до 33% (свинина), молоке от 3–4% (молоко коровье) до 18% (молоко оленя), рыбе от 10% до 25% (осетровые), в растительных объектах от 3–5% (пшеница, кукуруза) до 30–70% (семена подсолнечника — кокосовая пальма), в микроорганизмах — до 60% биомассы.

Некоторые свойства жирных кислот представлены в табл. 8.10.

Таблица 8.10

Основные жирные кислоты и их производные

Русское наименование	Обозначение	Английское наименование	Структурная формула	ММ	S_{H_2O} г/100 г	$S_{дл г на 100 г}$
Масляная	C(4:0)	Butyric (Butanoic)	$CH_3(CH_2)_2COOH$	88	5,6	∞
Валериановая	C(5:0)	Pentanoic (Valeric)	$CH_3(CH_2)_3COOH$	102	3,7	∞
Капроновая	C(6:0)	Hexanoic (Caproic)	$CH_3(CH_2)_4COOH$	116	0,88	∞
Энантовая	C(7:0)	Heptanoic (Epanthic)	$CH_3(CH_2)_5COOH$	130	0,2	P
Каприловая (Октановая)	C(8:0)	Octanoic (Caprylic)	$CH_3(CH_2)_6COOH$	144	0,25	P
Пеларгоновая (Нонилловая)	C(9:0)	Nonanoic (Pelargonic)	$CH_3(CH_2)_7COOH$	158	TP	P
Каприновая (Дециловая)	C(10:0)	Decanoic (Capric)	$CH_3(CH_2)_8COOH$	172	0,015	326
Ундециловая (Ундекановая)	C(11:0)	Undecanoic	$CH_3(CH_2)_9COOH$	186	HP	P
Лауриновая	C(12:0)	Lauric (Dodecanoic)	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	200	0,005	83
Тридекановая	C(13:0)	Tridecanoic	$CH_3(CH_2)_{11}COOH$	214	HP	P
Миристиновая	C(14:0)	Myristic	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	228	0,002	32
Пентадекановая	C(15:0)	Pentadecanoic	$CH_3(CH_2)_{13}COOH$	242	0,001	P
Пальмитиновая	C(16:0)	Palmitic	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	256	HP	15
Маргариновая	C(17:0)	Margaric	$CH_3(CH_2)_{15}COOH$	270	HP	P
Стеариновая	C(18:0)	Stearic	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	284	HP	P
Нонадекановая	C(19:0)	Nonadecanoic	$CH_3(CH_2)_{17}COOH$	298	HP	P

Русское наименование	Обозначение	Английское наименование	Структурная формула	ММ	S _{H₂O} г/100 г	S _{хол} г на 100 г
Арахидиновая	C(20:0)	Arachidic	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	312	HP	P
Бегеновая	C(22:0)	Behenic	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	340	MP	P
Лигноцериновая	C(24:0)	Lignoceric	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	368	HP	P
Мононенасыщенные						
Пальмитолеино-вая	C(16:1)	Palmitoleic	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	254	HP	P
Олеиновая (цис-9-октадеценовая)	C(18:1)	Oleic	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	282	HP	P
Эруковая	C(22:1)	Erucic	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₁₁ COOH	338	HP	P
Полиненасыщенные						
Линолевая (цис-9-цис-12-октадека-диеновая), w	C(18:2)	Linolic	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	280	HP	∞
Линолевая (цис-9-цис-12-цис-15-октадека-триеновая), w	C(18:3)	Linolenic	CH ₃ (CH ₂ CH=CH) ₃ (CH ₂) ₇ COOH	278	HP	P
Арахидоновая (цис-5-цис-8-цис-11-цис-14-эйко-зантаэраеновая)	C(20:4)	Arachidonic	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CH – CH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COOH	304	HP	P
ω-3-эйкозапента-еновая	C(20:5)	Cis-5,8,11,14,17- eicosa-pentaenoic	CH ₃ (CH ₂ CH=CH) ₅ (CH ₂) ₅ COOH	302	HP	P
ω-3-докозагекса-еновая	C(22:6)	Cis-4,7,10,13,16,19-doco-saheenoic	CH ₃ (CH ₂ CH=CH) ₆ (CH ₂) ₅ COOH	328	HP	P

Таблица 8.11

Содержание жирных кислот в некоторых пищевых продуктах, г/100 г массы

Наименование	Мышцы к.р.с	Жир говяжий	Мышцы свиной	Жир свиной	Жир бараний	Масло оливковое	Масло подсол- нечное	Жир рыб	Молоко ко-	Картофель	Пшеница
Σ липидов	2,5	99,7	3,5	99,7	99,7	99,8	99,9	100	3,6	0,4	2,1
Холестерин	0,06	0,11	0,06	0,1	0,1	–	–	–	0,01	–	–
Σ жирных кислот	2,3	94,7	3,18	95,8	94,2	94,7	94,9	96,1	3,41	0,34	1,5
Насыщенные	1,1	50,9	1,2	39,6	51,2	15,7	11,3	16,4	2,1	0,09	0,3
В.т.ч. C(4:0)	–	–	–	–	–	–	–	–	0,1	–	–
C(6:0)	–	–	–	–	–	–	–	–	0,08	–	–
C(8:0)	–	–	–	–	–	–	–	–	0,04	–	–
C(10:0)	–	0,1	–	0,12	0,1	–	–	–	0,09	–	–
C(12:0)	–	0,6	–	0,2	0,2	–	–	–	0,1	–	–
C(14:0)	0,06	3,4	0,05	1,4	3,2	–	–	5,4	0,51	0,002	сл.
C(15:0)	0,01	0,7	0,01	0,02	0,5	–	–	–	–	–	–
C(16:0)	0,65	24,7	0,80	24,3	24,8	12,9	6,2	9,9	0,64	0,07	0,26

Наименование	Мышцы к.р.с	Жир говяжий	Мышцы свиной	Жир свиной	Жир бараний	Масло оливковое	Масло подсолнечное	Жир рыб	Молоко ко-	Картофель	Пшеница
C(17:0)	0,02	1,4	0,01	0,3	1,4	–	–	–	0,02	–	–
C(18:0)	0,37	20,0	0,37	12,5	21,0	2,5	4,1	0,9	0,35	0,02	0,02
C(20:0)	–	–	–	0,8	–	0,35	0,3	–	0,04	–	сл.
C(22:0)	–	–	–	–	–	–	0,7	–	–	–	–
Мононенасыщенные	1,05	40,6	1,6	45,6	38,9	66,9	23,8	51,8	1,06	0,17	0,26
В.т.ч. C(14:1)	0,02	1,1	сл.	0,01	0,5	–	–	–	0,05	–	сл.
C(16:1)	0,08	3,0	0,12	2,5	1,5	1,5	сл.	14,1	0,09	0,005	0,01
C(18:1)	0,89	36,5	1,5	43,0	36,9	64,9	23,7	21,2	0,78	0,16	0,25
C(20:1)	–	–	–	–	–	0,5	сл.	10,6	–	–	сл.
C(22:1)	–	–	–	–	–	–	–	5,2	–	–	–
Полиненасыщенные	0,13	3,2	0,32	10,6	4,1	12,1	59,8	27,9	0,21	0,08	1,0
В.т.ч. C(18:2)	0,1	2,5	0,24	9,4	3,1	12,0	59,8	1,6	0,09	0,08	0,9
C(18:3)	0,02	0,6	0,04	0,7	0,9	сл.	–	0,4	0,03	–	0,08
C(20:4)	0,02	0,1	0,04	0,5	0,1	–	–	1,2	0,09	–	–

Ценность пищевых жиров зависит от их усвояемости. Считается, что говяжий жир усваивается на 80–94%, бараний на 80–90%, свиной 96–98%, сливочное масло на 93–99%, степень усвоения растительных жиров как правило, превосходит указанный уровень. Наилучшей усвояемостью обладают жиры, состоящие из смешаннокислотных триглицеридов, которые обладают лучшей растворимостью, эмульгируемостью и способностью расщепляться. Высокое содержание триглицеридов с двойными связями снижает их эмульгируемость и биодegradацию в живом организме. Жиры с содержанием высоконепредельных кислот в количестве более 15% не усваиваются, оптимальное содержание таких кислот в жире составляет около 4%.

Химический состав жиров в питании имеет весьма существенное значение. Особое внимание уделяется полиненасыщенным кислотам с определенным положением двойных связей и цис-конфигурацией, в первую очередь линолевой, линоленовой, олеиновой, арахидоновой и полиненасыщенных кислот семейства $\omega 3$. Линолевая и линоленовая кислоты не синтезируются в организме человека, арахидоновая синтезируется из линоленовой, поэтому линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты относят к незаменимым жирным кислотам.

Среди продуктов питания полиненасыщенные жирные кислоты больше всего содержатся в растительных маслах: 50–60% линолевой кислоты в соевом, кукурузном, подсолнечном маслах, в животных жирах содержание линолевой кислоты составляет 0,5–0,6%. Суточная потребность человека в линолевой кислоте составляет 6–10 г (минимальная — 2 г). Арахидоновая кислота содержится в яйце — 0,5%, субпродуктах животного происхождения 0,3–0,5%.

Биологическая активность жирных кислот существенно различается. Наибольшей активностью обладает арахидоновая кислота, высокой — линолевая, активность линоленовой кислоты в 10 раз ниже, чем у линолевой. Полезные функции липидов, связанные с построением клеточных мембран, агрегацией тромбоцитов, выведением избытка холестерина из организма, повышением эластичности стенок кровеносных сосудов, реализуются только при наличии цис-изомеров ненасыщенных жирных кислот.

По современным представлениям науки о питании представляется, что молодой здоровый организм человека должен потреблять в составе липидов 10–20% полиненасыщенных, 50–60% мононенасыщенных и 30% насыщенных C10–18 жирных кислот. Такое сбалансированное питание реализуется в рационе, содержащем 1/3 растительных и 2/3 животных жиров. Для людей пожилого возраста содержание линоле-

вой кислоты должно составлять около 40% и линоленовой — 4%, соотношение полиненасыщенных и насыщенных кислот — 2:1.

Используя термин «сырой жир», обычно имеют ввиду извлекаемую из сырья смесь, в состав которой, входят жирорастворимые пигменты (каротиноиды, хлорофиллы, госсипол), жирорастворимые компоненты (витамины и кофакторы), стерин (холестерин, содержание которого составляет от 0,56% в яйце, 0,06–0,1% в мясе до 0,2–1,6% в сливочном масле и сырах), воски и собственно липиды, которые обычно подразделяют на ацилированные глицерины формулы $R_1COOCH_2-CH(OCOR_2)-CH_2OCOR$ (жиры, масла; R, R₁, R₂ — остатки жирных кислот) и фосфолипиды (фосфатиды) формулы $R_1COOCH_2-CH(OCOR_2)-CH_2OP(O)O-X$, где X = H, CH₂CH₂N+(CH₃)₃, CH₂CH₂N+H₃, CH₂CH(COOH)NH₂.

Различают триглицериды, у которых все гидроксилы глицерина замещены остатками жирных кислот, диглицериды, у которых вместо R₁CO содержится OH и моноглицериды, у которых вместо R₁CO и —OCOR₂ имеются —OH. Аналогично моно-, ди- и трифосфатиды для производных глицерина, этерифицированных остатками фосфорной кислоты (вместо OH в формуле содержится звено OPO(OH)(OB), где: B = азотсодержащий радикал или остаток аминокислоты).

Биохимическая роль жиров заключается в том, что они являются источником энергетического и пластического материала для живых клеток, т.е. являются незаменимыми факторами питания.

Рекомендуемое по калорийности содержание жиров в рационе человека составляет до 30% для населения юга и до 40% для населения северных регионов. Недостаток жиров приводит к отклонениям в деятельности центральной нервной системы, снижению иммунитета и сокращению продолжительности жизни. Избыток жирной пищи приводит к ожирению, сердечно-сосудистым заболеваниям и преждевременному старению.

В процессе хранения жиросодержащих композиций липиды подвергаются деструктивным изменениям, связанным с окислительным гидролизом полиглицеридов («прогоркание» жиров). Скорость таких процессов определяется температурой хранения, которая в оптимальном составе составляет для растительных жиров 4–6 °С, для животных < –20 °С, герметичностью упаковки (кислород существенно ускоряет старение и порчу жиров), отсутствием света, активностью микрофлоры (биохимическое прогоркание), а также содержанием искусственно привносимых стабилизаторов-антиокислителей, в качестве которых применяют различные природные и синтетические органические вещества.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ ЖИРА

Метод основан на экстрагировании жира из образца органическим растворителем с последующим гравиметрическим определением его содержания по отношению к исходному образцу.

АППАРАТУРА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Гомогенизатор типа микроразмельчителя тканей РТ-2. Термостат на 50–120 °С. Устройство для непрерывной экстракции Сокслета, состоящее из круглодонной колбы с кипящим растворителем вместимостью 0,5 л, в шлиф-горловину которой вставлен резервуар с экстрагируемой пробой, содержащий в верхней части присоединенный на шлифе обратный шариковый холодильник Либиха. Пары кипящего растворителя из колбы с кусочками пемзы или пористого фарфора поступают по отводной стеклянной трубке в камеру резервуара и конденсируются в его верхней части в холодильнике, стекая обратно в резервуар. После накопления жидкости в резервуаре с образцом до верхней части сливного капилляра жидкость стекает по сливному капилляру обратно в круглодонную колбу с кипящим растворителем. Нагреватель круглодонной колбы. Эксикатор с осушителем. Пробирка или стеклянный цилиндр. Роторный испаритель.

Хлороформ чда. Бумага фильтровальная обезжиренная. Вата обезжиренная. Этанол 95%, ректификованный.

ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛОВ

Вату и фильтровальную бумагу помещают в экстрактор Сокслета и подвергают экстрагированию кипящим хлороформом или диэтиловым эфиром в течение 2 ч. Экстрагированные материалы извлекают, высушивают при температуре выше температуры кипения использованных растворителей (50–60 °С) и сохраняют в герметичной упаковке (эксикатор с осушителем).

Перед определением из обезжиренной бумаги сворачивают, наматывая на пробирку стеклянный цилиндр или плотный цилиндр из бумаги (диаметр цилиндрика и его длина должны быть меньше размеров резервуара камеры аппарата Сокслета), нижний край бумажного цилиндрика плотно заворачивают. Вниз цилиндрика во избежание разворачивания при экстракции помещают кусочек обезжиренной ваты.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В бумажный цилиндр берут навеску образца около 5 г, сверху помещают кусочек обезжиренной ваты, бумажный цилиндр плотно заворачивают и помещают в аппарат Сокслета. Определяют массу пустой колбы — g_k . Собранный аппарат нагревают в течение 3–6 ч с использованием соответствующего нагревательного устройства (баня, плитка, колбонагреватель), обеспечивая равномерное кипение растворителя, залитого в колбу. Конец кипячения определяют визуально, отбирая каплю экстракта из охлажденной камеры аппарата и помещая ее на чистое часовое стекло. Экстракцию считают законченной, если после испарения органического растворителя на стекле не остается жировых пятен.

По окончании аппарат разбирают, из колбы отгоняют летучие компоненты (органический растворитель и воду), присоединяя колбу к роторному испарителю или установке для перегонки жидкостей. Завершают отгонку летучих растворителей при температуре 100–105 °С (> T_k воды) до постоянной массы. Колбу взвешивают после ее охлаждения в эксикаторе через каждые 15 мин сушки, масса считается постоянной, если отличается от предыдущей не более, чем на 0,0004 г.

РАСЧЕТ

Массовую долю жира в образце X (в %) вычисляют по формуле:

$$X = 100 \cdot (G_{\text{жир}} - g_k) / g,$$

где: $G_{\text{жир}}$ — масса колбы с высушенным жиром, г; g_k — масса пустой колбы, г; g — навеска анализируемого образца, г.

Конечным результатом принимают среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до второго десятичного знака.

Допустимое расхождение двух параллельных определений не должно быть более 0,4% абсолютного содержания жира.

Допустимое расхождение результатов независимых определений не должно превышать 0,8% абсолютного содержания жира.

Поскольку экстрагирование горячим хлороформом, дающим при кипении азеотроп, позволяет одновременно удалить из анализируемого образца и влагу и жир, можно оценить влагосодержание образца. Для этого первоначально определяют взвешиванием исходную массу бумажного цилиндрика — g_1 , массу исходной навески образца — g_o ,

проводят как указано экстракцию в аппарате, экстрагированный образец в бумажном цилиндрике извлекают, высушивают до постоянной массы при 105 °С — g_2 . ($g_2 = g_1 + g_{c.o.}$; $g_{c.o.}$ — масса сухого остатка обезжиренного и обезвоженного экстракцией образца; $g_{c.o.} = g_2 - g_1$). Количество выделенного жира определяют отгонкой летучих, как указано выше — $g_{\text{жир}} = (G_{\text{жир}} - g_k)$.

Оценку массовой доли воды в образце Y (в %) проводят по формуле:

$$Y = 100 \cdot [g_o - (g_{c.o.}) - (g_{\text{жир}})] / g_o = 100 \cdot [g_o - (g_2 - g_1) - (G_{\text{жир}} - g_k)] / g_o,$$

где: $G_{\text{жир}}$ — масса колбы с высушенным жиром, г; g_k — масса пустой колбы, г; $g_{\text{жир}}$ — масса выделенного и высушенного жира, г; g_1 — масса бумажного цилиндрика, г; g_2 — масса сухого остатка и масса бумажного цилиндрика (g_1), г; $g_{c.o.}$ — масса сухого остатка обезжиренного и обезвоженного экстракцией образца; g_o — навеска анализируемого образца, г.

Допустимое расхождение результатов независимых определений $\pm 1\%$ от абсолютного содержания воды.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ СВОБОДНО ИЗВЛЕКАЕМОГО ЖИРА

Метод основан на растворении липидов в бинарной смеси органических растворителей, их отделении и гравиметрическом определении массовой доли извлекаемого жира.

АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Шкаф сушильный лабораторный на 25–250 °С. Баня водяная. Стаканчики или бюксы стеклянные. Бюксы металлические диаметром 50 мм, высотой 25–35 мм. Эксикатор с осушителем (CaCl_2 безводный). Воронка делительная фильтрующая со шлифом и с впаянным стеклянным фильтром № 2 или № 3. Приемник стеклянный с краном и со шлифом диаметром, соответствующим диаметру делительной воронки. Насос водоструйный лабораторный стеклянный. Колба мерная вместимостью 50 мл. Воронка стеклянная диаметром от 25 до 30 мм. Пипетка на 1–25 мл.

Спирт этиловый 95%, ректифицированный. Хлороформ хч.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску образца массой около 2 г взвешивают с допустимой погрешностью не более 0,0002 г в стеклянном стаканчике или бюксе.

Навеску количественно переносят в фильтрующую делительную воронку, приливают 20 мл экстрагирующей смеси, состоящей из хлороформа и этилового спирта в соотношении 2:1, и проводят экстракцию, встряхивая воронку в течение 2 мин.

Полученный экстракт с помощью водоструйного насоса отсасывают в присоединенный к воронке приемник, а из него переливают в мерную колбу вместимостью 50 мл.

Экстракцию проводят дополнительно экстрагирующей смесью по 10 мл еще два раза аналогично первой. По окончании третьей экстракции воронку и приемник ополаскивают 5 мл экстрагирующей смеси. Все три экстракта и промывную жидкость, собранные в мерной колбе, доводят до метки добавлением экстрагирующей смеси. Смесь тщательно перемешивают. Затем отбирают пипеткой 20 мл экстракта и переносят в предварительно высушенную и взвешенную бюксу. Для удаления растворителей бюксу нагревают на кипящей водяной бане до исчезновения запаха растворителей.

Бюксу с жиром сушат в течение 10 мин при температуре $(70 \pm 2)^\circ\text{C}$, охлаждают в эксикаторе над хлористым кальцием до комнатной температуры и взвешивают на весах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЛИПИДНЫХ ПРИМЕСЕЙ.

В бюксу с подсушенной навеской жира приливают 10 мл хлороформа и через 5 мин хлороформный раствор сливают. Такое отделение липидов растворением повторяют аналогично еще два раза. После этого бюксу помещают в сушильный шкаф и подсушивают в течение 5 мин при температуре $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

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

$$X = 50 \cdot (g_1 - g_2) \cdot 100 / 20 \cdot g,$$

где: g_1 — масса бюксы с жиром, г; g_2 — масса бюксы с нелипидной фракцией, г; 50 — общий объем экстракта, мл; g — масса навески, г; 20 — объем экстракта, взятый для высушивания, мл.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Допустимое расхождение двух параллельных определений не должно быть более 0,5% от абсолютного содержания жира.

Допустимое расхождение результатов независимых определений в разных лабораториях не должно превышать 1% от абсолютного содержания жира.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНО-КИСЛОТНОГО СОСТАВА ЖИРОВ И МАСЕЛ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Метод основан на получении метиловых эфиров жирных кислот, содержащихся в анализируемых жирах, и их количественном определении с помощью газо-жидкостной хроматографии на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором.

Метод предназначен для определения «жирнокислотного спектра» пищевых продуктов с использованием газового хроматографа.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с. Микроизмельчитель ткани. Термостатируемая баня с регулируемым нагреванием 20–100 °С.

Колбы перегонные К-1–250–29/32. Колбы Гр-25–14/23. Колбы мерные 2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В-56–80 ХС. Колба коническая Кн-1–250–29/32. Цилиндры мерные 1–50, 1–100. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 мл. Стеклянные банки с притертыми крышками. Воронки делительные ВД-100–29/32, ВД-250–29/32. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1–10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Бумага фильтровальная лабораторная. Обратный холодильник Либиха на шлифах.

Газовый хроматограф Газохром 1109, Цвет 104 или аналогичный, например типа Varian, с пламенно-ионизационным детектором.

Микрошприц МШ 10 или аналогичный для ввода 0,1–20 мкл пробы закомом через мембрану инжектора хроматографа.

Колонки хроматографические стеклянные для газового хроматографа длиной 2,0 м и диаметром 3 мм или капиллярная колонка длиной 30–50 м и внутренним диаметром 0,3–0,5 мм.

Баллон стальной для сжатого газа, номинальное давление 150 ат.

Азот газообразный, марки «особой чистоты» или азот с содержанием кислорода не более 0,004% или гелий. Водород газообразный (99,9% чистоты) без органических примесей или генератор водорода. Сжатый воздух без органических примесей или компрессор.

Насадки для колонки (наполнение набивных колонок): 3–5% OV-275 на хроматоне N–AW–DMCS (0,16–0,20 мм) или другие, дающие необходимое хроматографическое разделение, или капиллярная колонка в соответствии с документацией к газовому хроматографу.

РЕАКТИВЫ

Калия гидроксид, хч, экстрагированный очищенным гексаном. Дистиллированная вода. Индикаторная бумага pH. Хлороформ, хч. Метанол, хч, абсолютный. Гексан, ч, очищенный концентрированной серной кислотой, отмытый дистиллированной водой, высушенный кристаллическим гидроксидом калия и перегнанный с дефлегматором, или хч. Кислота серная, хч, плотностью 1,84 г/см³. Кислота соляная, хч, концентрированная. Натрий металлический или метилат натрия.

Эталоны метиловых эфиров определяемых жирных C4–22 жирных кислот гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%, рабочий раствор 1 мкг/мл.

Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРА ДЛЯ МЕТАНОЛИЗА

2 М раствор метилата натрия в метаноле получают растворением 10,8 г метилата натрия или 4,6 г металлического натрия в 100 мл абсолютного метанола или растворяют 11,2 г КОН в 100 мл абсолютного метанола.

ПОДГОТОВКА ГАЗОВОГО ХРОМАТОГРАФА

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ

Сухую стеклянную колонку, предварительно промытую хромовой смесью, этиловым спиртом, затем диэтиловым эфиром, заполняют носителем с помощью вакуумного или водоструйного насоса. При этом набивку колонки периодически уплотняют, постукивая по колонке деревянной палочкой. Установленную в термостате хроматографическую колонку перед работой кондиционируют в следующем режиме: 2 ч при 100 °С; 2 ч при 150 °С; 4 ч при 200 °С; 4 ч при 250 °С. При кондиционировании колонка должна быть отключена от детектора.

Кондиционирование следует проводить при смене колонки, а также после длительных перерывов в работе. При использовании капиллярной колонки проводят ее подготовку в соответствии с технической документацией к прибору.

ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

50 мг липидов (жиры или масла) растворяют в 1 мл хлороформа или гексана при комнатной температуре. Добавляют 10 мл метанола и 3 гранулы твердого КОН. Гидролиз проводят при комнатной температуре в течение суток, затем корректируют pH смеси до 4,0 добавлением концентрированной HCl. Смесь перемешивают, отстаивают в течение 5 мин, добавляют 6 мл воды.

Полученный гексановый раствор метиловых эфиров жирных кислот анализируют на приборе методом ГЖХ или подвергают дополнительной очистке.

Смесь подвергают отмыванию водой 2–3 раза, каждый раз оставляя органический слой, добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты, жидкость декантируют с осадка, переливают в чистую делительную воронку, добавляют 10 мл гексана, перемешивают, нижний слой удаляют, а гексановый слой упаривают на роторном испарителе досуха, перерастворяют в 1 мл гексана и используют для газохроматографического анализа.

Раствор метиловых эфиров жирных кислот в гексане хранят в холодильнике не более суток.

ПРОБОПОДГОТОВКА ПРИ АНАЛИЗЕ СВЯЗАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (метанолиз нейтральных свежих жиров с кислотным числом <2)

Смешивают 50 мг образца с 1 мл гексана, 0,5 мл 2 М раствора метилата натрия или гидрата окиси калия и встряхивают в течение 1 мин. Смесь отстаивают для отделения метанольно-глицеринового слоя, верхний гексановый слой используют для ГЖХ.

УСЛОВИЯ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

0,2 мкл гексанового экстракта, содержащего экстрагированные из пробы по методике метиловые эфиры жирных кислот, вводят в испаритель газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором и анализируют при программируемом изменении температуры колонки с 120 до 240 °С (6 о/мин), температуре испарителя 250 °С, температуре детектора 300 °С, расход инертного газа на набивную колонку 75 мл/мин.

При тех же условиях анализируют гексановый раствор 1 мкг/мл эталонов метиловых эфиров жирных C_{4-22} кислот. Времена удержания для $30 \text{ м} \times 0,3 \text{ мм}$ капиллярной колонки с химически сшитой неподвижной фазой Carbowax составляет от 2,5 до 48 мин для $C(4:0)$ и $C(22:1)$ соответственно.

Для проведения количественного анализа строят калибровочные графики зависимости логарифмов времени удержания от числа углеродных атомов в цепи. Идентифицируют полученные пики по градуировочному графику или временам удержания соответствующих стандартов с использованием автоматической компьютерной программы обработки хроматографических данных.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание метиловых эфиров жирных C_{4-22} кислот X (мг/кг) в анализируемом сырье вычисляют автоматически или в соответствии с градуировочными графиками по формуле:

$$X = m_1 \cdot V_1 / m_2 \cdot V_2,$$

где m_1 — масса метиловых эфиров жирных C_{4-22} кислот, найденная по градуировочному графику, мкг; V_1 — общий объем раствора, из которого взята аликвота для хроматографирования, мл; m_2 — масса анализируемой пробы, г; V_2 — объем аликвоты, вводимой в хроматограф, мкл.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 30% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания определяемых веществ в любой пробе при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов $\pm 0,15X$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУБИНЫ ГИДРОЛИЗА ЖИРОВ

При хранении жиры и масла медленно разлагаются с выделением свободных жирных кислот, которые можно оттитровать щелочами. Метод основан на титровании пробы гидролизованного жира раствором щелочи.

АППАРАТУРА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Термостат на 20–120 °С. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 100 мл. Бюретка на штативе.

Нейтрализованная смесь диэтилового эфира и 96% этанола (2:1). 0,5 М или 1 М спиртовой раствор NaOH. Фенолфталеин, 10% спиртовой раствор.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску жира в количестве 2 г подсушивают в течение 5 мин при температуре 105 °С, растворяют ее в 50 мл нейтральной смеси диэтилового эфира и 96%-этанола (2:1).

К раствору добавляют 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 М раствором NaOH до не исчезающей в течение 1 мин слабо-розовой окраски раствора.

РАСЧЕТ

Глубину расщепления X (% свободных жирных кислот) в пересчете на олеиновую кислоту рассчитывают по формулам при титровании 0,5 М раствором NaOH: $X = 14,1 \cdot V \cdot K / g$; при титровании 1 М раствором NaOH: $X = 28,2 \cdot V \cdot K / g$, где V — количество раствора NaOH, пошедшее на титрование навески, мл; K — поправка к титру растворов; g — навеска жира, г.

Коэффициент 14,1 уточняют экспериментально для конкретного образца жира в зависимости от реального содержания в нем олеиновой кислоты.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при $p = 0,95$ превышать $\pm 0,5\%$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ЖИРОВ И МАСЕЛ

КИСЛОТНОЕ ЧИСЛО (КЧ, к.ч.) — это количество миллиграммов гидроксида калия КОН, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира или масла.

Метод основан на титровании содержащихся в жире и маслах свободных жирных кислот в присутствии индикатора.

АППАРАТУРА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 100 мл. Бюретка на штативе.

Нейтрализованная смесь диэтилового эфира и 96% этанола (2:1). 0,1 М спиртовой раствор КОН. Фенолфталеин, 1% спиртовой раствор.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску жира или масла в количестве 4 г, взятую в коническую колбу, смешивают с 50 мл нейтрализованной смеси диэтилового эфира и 96% этанола (2:1).

К раствору добавляют 4 капли спиртового раствора фенолфталеина, перемешивают в течение времени, достаточном для максимальной гомогенизации смеси и титруют из бюретки 0,1 М раствором КОН до исчезающей в течение 30 секунд слабо-розовой окраски раствора.

РАСЧЕТ

Кислотное число КЧ (мгКОН/г) рассчитывают по формуле:

$$\text{КЧ} = 5,611 \cdot V \cdot K / g,$$

где: 5,611 — титр 0,1 М раствора КОН; V — количество раствора КОН, пошедшее на титрование, мл; K — поправка к титру; g — навеска жира, г.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при $p = 0,95$ превышать $\pm 0,5\%$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА В СИЛЬНО ОКРАШЕННЫХ СМЕСЯХ, СОДЕРЖАЩИХ ЛИПИДЫ

Метод основан на титровании в солевой среде содержащихся в жире и маслах свободных жирных кислот в присутствии индикатора без применения органических растворителей. После нейтрализации всех жирных кислот избыток щелочи переходит в раствор соли и окрашивает его в присутствии фенолфталеина в светло-розовый цвет.

АППАРАТУРА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 250 мл с пришлифованной пробкой. Бюретка на штативе.

Нейтрализованный насыщенный раствор NaCl. 0,1 М водный раствор КОН. Фенолфталеин, 1% спиртовой раствор.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску жира или масла в количестве 10 г, взятую в коническую колбу, смешивают с 50 мл нейтрализованного насыщенного раствора NaCl и 0,5 мл раствора фенолфталеина, перемешивают в течение времени, достаточном для максимальной гомогенизации смеси и титруют из бюретки 0,1 М раствором КОН.

При титровании встряхивание повторяют после прибавления каждой 5 капель раствора щелочи, до тех пор, пока не исчезнет окраска нижнего слоя жидкости. Замедление исчезновения окраски после очередного встряхивания должно сопровождаться более частым встряхиванием колбы, после добавления 1–2 капель раствора щелочи.

РАСЧЕТ

Кислотное число КЧ (мг КОН/г) рассчитывают по формуле:

$$\text{КЧ} = 5,611 \cdot V \cdot K / g,$$

где 5,611 — титр 0,1 М раствора КОН; V — количество раствора КОН, пошедшее на титрование, мл; K — поправка к титру; g — навеска жира, г.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при $p = 0,95$ превышать $\pm 0,5\%$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ЧИСЛА ЖИРОВ

ПЕРЕКИСНОЕ ЧИСЛО (ПЧ, п.ч.) — это количество граммов йода, выделенного из йодистого калия перекисями, содержащимися в 100 г жира или масла.

Метод основан на титровании йода, выделяемого из йодистого калия перекисными соединениями жиров, тиосульфатом натрия в присутствии крахмала.

АППАРАТУРА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 250 мл с притертой пробкой. Бюретка на штативе. Секундомер. Водяная баня на 100 °С. Цилиндр мерный вместимостью 100 мл.

Хлороформ хч. Уксусная кислота хч, 100%, ледяная. Калий йодид KI, свежеприготовленный насыщенный раствор ($S_{H_2O} > 145$ г/100г воды при 20 °С). Тиосульфат натрия чда, 0,01 н. раствор, готовят растворением $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ в дистиллированной воде или из фиксанала. Крахмал картофельный ч, 1% раствор, готовят смешением 1 г крахмала с 20 мл холодной воды и добавлением при перемешивании 80 мл кипящей воды. Вода дистиллированная.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску жира или масла в количестве 1 г, взятую в коническую колбу, расплавляют на водяной бане и по стенке колбы, смывая капли жира, добавляют 10 мл хлороформа, перемешивают смесь, затем добавляют 10 мл ледяной CH_3COOH и быстро вливают 0,5 мл насыщенного свежеприготовленного раствора KI. Колбу закрывают пробкой, перемешивая содержимое вращательным движением, и включают секундомер. Через 3 мин в колбу вливают 1 мл 1% раствора крахмала, 100 мл дистиллированной воды и титруют 0,01 н. раствором тиосульфата натрия до исчезновения синей окраски. В конце титрования раствор тиосульфата добавляют по капле, перемешивая содержимое после каждого добавления раствора $Na_2S_2O_3$.

Параллельно проводят холостой опыт, взяв вместо жира 1 мл воды. Качество используемых для анализа реактивов считается приемлемым, если на контрольное определение в холостом опыте израсходовано не более 0,07 мл 0,01 н. раствора тиосульфата натрия.

РАСЧЕТ

Перекисное число ПЧ (г I₂/100 г или%) рассчитывают по формуле:

$$ПЧ = (V_1 - V_2) \cdot 0,00127 \cdot K \cdot 100 / g,$$

где: V_1 — количество 0,01 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование пробы с навеской жира, мл; V_2 — количество 0,01 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование контрольной пробы без навески жира, мл; K — поправочный коэффициент 0,01 н. раствора тиосульфата, равный 1 при приготовлении 0,01 н. раствора тиосульфата из фиксанала; 0,00127 — количество г йода, эквивалентное титру 0,01 н. раствора тиосульфата натрия; g — навеска жира, г.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при вероятности $p = 0,95$ превышать $\pm 0,5\%$.

Степень порчи жира оценивается по величине перекисного числа. При величине ПЧ < 0,03 пищевой жир считается свежим, при значении ПЧ от 0,03 до 0,06 жир свежий, но не подлежащий хранению, при значении ПЧ от 0,06 до 0,1 жир оценивают как сомнительной свежести и для значения ПЧ > 0,1 жир является испорченным.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДНОГО ЧИСЛА ЖИРОВ

ЙОДНОЕ ЧИСЛО (ИЧ, и.ч.) — это количество граммов йода, вступающего в реакцию с 100 г жира или масла.

Метод основан на титровании избытка йода, не вступившего в реакцию с ненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав анализируемых жиров, тиосульфатом натрия в присутствии крахмала по методу Гюбеля.

АППАРАТУРА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 500 мл с притертой пробкой. Бюретка на штативе. Часы. Водяная баня на 100 °С. Цилиндр мерный вместимостью 100 и 500 мл. Устройство для фильтрования через бумажный фильтр.

Хлороформ хч. Спирт этиловый 95% ректификованный. Раствор Гюбеля, готовят смешением равных объемов (1:1) раствора А (25 г йода I₂ в 500 мл спирта этилового) и профильтрованного раствора Б (30 г хлорида ртути (II) — сулемы $HgCl_2$ в 500 мл спирта этилового); растворы А и Б хранят в темноте отдельно, смесь (1:1) хранят в темноте не более 2 суток. Калий йодид KI чда, 20% раствор. Тиосульфат натрия чда, 0,1 н. раствор, готовят растворением $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ в дистиллированной воде или из фиксанала. Крахмал картофельный, 1% раствор, готовят смешением 1 г крахмала с 20 мл холодной воды и добавлением при перемешивании 80 мл кипящей воды. Вода дистиллированная.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску жира или масла в количестве 0,6 г, взятую в коническую колбу, расплавляют на водяной бане и по стенке колбы, смывая капли жира, добавляют 15 мл хлороформа, перемешивают смесь, затем

добавляют 25 мл раствора Гюбеля быстро закрывают пробкой смоченный раствором йодида калия, перемешивая содержимое вращательным движением, и ставят пробы в темное место на 18 часов при температуре 20 °С. Через 18 ч в колбу вливают 15 мл 20%-ного раствора KI, 100 мл дистиллированной воды и титруют 0,1 н. раствором тиосульфата натрия до появления светло-желтой окраски. В конце титрования в смесь добавляют 5 капель 1%-ного раствора крахмала, раствор Na₂S₂O₃ добавляют по капле, перемешивая содержимое после каждого добавления титранта, до исчезновения голубовато-фиолетового окрашивания.

Параллельно проводят холостой опыт, взяв вместо жира 0,6 мл воды.

РАСЧЕТ

Йодное число ИЧ (гI₂/100 г жира или%) рассчитывают по формуле:

$$\text{ИЧ} = (V_1 - V_2) \cdot 0,01269 \cdot K \cdot 100 / g,$$

где V₁ — количество 0,1 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование контрольной пробы без навески жира, мл; V₂ — количество 0,1 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование опытной пробы с навеской жира, мл; K — поправочный коэффициент 0,1 н. раствора тиосульфата, равный 1 при приготовлении 0,1 н. раствора тиосульфата из фиксанала; 0,01269 — количество г йода, эквивалентное титру 0,1 н. раствора тиосульфата натрия; g — навеска жира, г.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при вероятности P = 0,95 превышать ±0,6% от определяемой величины.

8.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОВ

Углеводы вместе с белками и жирами образуют основную группу веществ клеток, являясь главным источником энергии для живого организма. Эта энергия высвобождается за счет биохимического окисления углеводов. Разделяют моносахариды, ди- и олигосахариды и полисахариды, состоящие из циклических гликозидных звеньев общей формулы C_x(H₂O)_x. Углеводы составляют более 75% органических ве-

ществ в мире и до 80% калорийности пищевого рациона человека. Некоторые важнейшие сахараиды и их содержание в различных продуктах приведены в табл. 8.12 и 8.13.

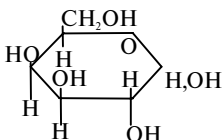
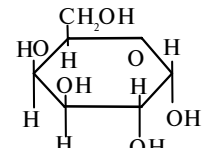
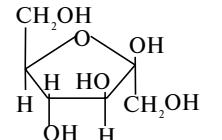
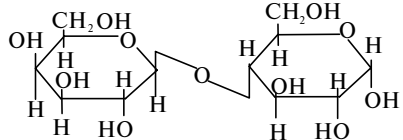
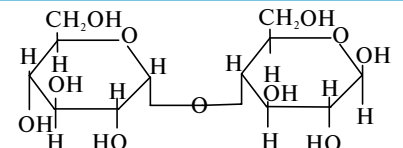
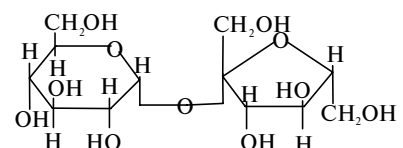
Углеводы входят в состав пищевых продуктов в связанном состоянии с другими биополимерами, образуя химические комплексы различной прочности, поэтому количественное определение сахаров связано с разрушением этих комплексов в условиях, когда возможно разрушение и самих сахаридов, что приводит к неоднозначности результатов количественного анализа.

Таблица 8.12

Важнейшие углеводы

Наименование	Структурная формула	Молекулярная масса	Растворимость, г/100 г	
			В воде	В этаноле
1	2	3	4	5
Моносахариды				
D-ксилоза (древесный сахар) D-Xylose		150,1	120	6,2
Ксилит Xylitol		152,1	P	MP
D-арабиноза D-Arabinose		150,1	59	0,5
N-ацетил-D-глюкозамин N-Acetyl-D-glucosamin		221,2	P	MP

Продолжение

Наименование	Структурная формула	Молекулярная масса	Растворимость, г/100 г	
			В воде	В этаноле
1	2	3	4	5
D-галактоза (цереброза) D-Galactose D-глюкоза (декстроза) D-Glucose		180,1	68	0,6
		180,2	154	4,9
D-фруктоза (фруктовый сахар) D-Fructose		180,2	375	6,5
Олигосахариды				
Лактоза (молочный сахар) D(+)-Lactose		342,3	17	0,09
Мальтоза D(+)-Maltose		342,3	108	MP
Сахароза (тростниковый сахар) D(+)-Sucrose		342,3	200	0,9

Окончание

Наименование	Структурная формула	Молекулярная масса	Растворимость, г/100 г	
			В воде	В этаноле
1	2	3	4	5
Полисахариды				
Крахмал (амилоза) Starch (amylose)		200 кДа	НР	НР

Таблица 8.13

Содержание углеводов в некоторых пищевых продуктах

Наименование	Моно- и дисахариды, г/100 г	Крахмал, г/100 г
Апельсины	8	0
Капуста	4	0,5
Картофель	1,3	16
Крахмал	следы	80
Крупа рисовая	0,8	74
Лук	9	0,1
Молоко коровье	4,7	—
Птица	0,5	—
Сахар	99,8	0
Хлеб	0	50
Яблоки	9	0,8
Яйцо	0,7	—

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОВ

Метод основан на способности углеводов образовывать с органическими реагентами окрашенные комплексы, поглощающие в видимой части спектра при заданной длине волны.

ОБОРУДОВАНИЕ

Спектрофотометр с кюветами или фотоэлектроколориметр. Термостат или водяная баня на 100 °С. Пробирки, мерные колбы, пипетки. Микроизмельчитель тканей. Колба вместимостью 250 мл с обратным холодильником и устройством для подогрева 20–100 °С. Установка для фильтрования через бумагу. Роторный испаритель. Мерные колбы вместимостью 100–250 мл.

РЕАКТИВЫ

Раствор углевода, содержащий 50–100 мг/мл основного вещества. Вода дистиллированная. Стандартные растворы глюкозы в воде, содержащиеся в 1 мл: 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг вещества.

Антроновый реактив. Готовят непосредственно перед определением путем растворения 0,25 г антрона в 25 мл дистиллированной воды, с последующим прибавлением к раствору 100 мл концентрированной серной кислоты.

Спирт этиловый ректификованный, 80% раствор в воде. Соляная кислота хч, разбавленный (1:1) водный раствор. Гидроксид натрия хч, 1 М раствор. Ацетат свинца чда, 30% раствор. Индикаторная бумага рН. Сульфат натрия хч, 1 М раствор. Дистиллированная вода.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

10 г измельченного образца заливают 50 мл 80%-ного этанола, нагревают смесь при 80 °С в течение 15 мин, спиртовую вытяжку отфильтровывают, остаток подвергают экстрагированию 80% спиртом еще 2 раза. Объединенный экстракт упаривают до объема 30 мл при температуре 40 °С для отделения этанола. Упаренный экстракт количественно переносят в круглодонную колбу, добавляют 2 мл разбавленной (1:1) соляной кислоты, греют смесь при температуре 70 °С в течение 3 мин и получают гидролизат, содержащий экстрагированные моносахариды и моносахариды, образованные при легком гидролизе из сахарозы, который количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и добавляют 100 мл дистиллированной воды.

К гидролизату добавляют по капле 1 М раствор гидроксида натрия до нейтральной реакции, прибавляют 2 мл 30% раствора ацетата свинца, перемешивают и отстаивают смесь в течение 1 ч, добавляют по капле раствор сульфата натрия до прекращения выпадения осадка для связывания избытка ацетата свинца и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор отстаивают и фильтруют.

ХОД РАБОТЫ

В соответствии с инструкцией по эксплуатации подготавливают к работе спектрофотометр.

В колбу заливают 4 мл раствора препарата, содержащего около 0,3 г сухого определяемого вещества или экстракта из измельченного пищевого продукта и доводят объем раствора до 100 мл.

В 2 пробирки заливают по 5 мл антронового реактива и осторожно по стенке приливают: в 1-ю — 1 мл раствора углевода (проба), во 2-ю — 1 мл воды (контроль).

Пробирки помещают в кипящую водяную баню и выдерживают при температуре 100 °С в течение 15 мин, охлаждают до комнатной температуры и проводят измерение поглощения при 540 нм против контроля.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Предварительно проводят определение содержания углеводов в растворах глюкозы с известной концентрацией, содержащих в 1 мл 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг вещества. Стандартные растворы можно готовить соответствующим разбавлением (1 г на 100 мл) раствора глюкозы.

РАСЧЕТ

Определение содержания углеводов в анализируемой пробе раствора в мкг/мл осуществляют по калибровочному графику (рис 8.6).

Процентное содержание углеводов в пробе, в пересчете на глюкозу, вычисляют по формуле:

$$X = a / 100 \cdot b,$$

где X — содержание углеводов в препарате, в г на 100 мл препарата; a — количество микрограммов глюкозы в 1 мл исследуемого раствора, найденное по калибровочной кривой; b — количество мл препарата, взятое для приготовления 100 мл раствора (или навеска).

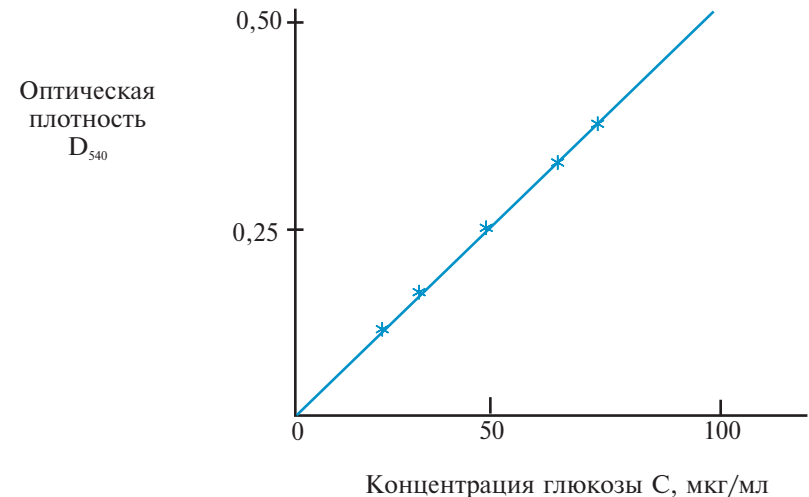


Рис. 8.6. Градуировочный график определения содержания углеводов с антроновым реактивом при 540 нм

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов трех параллельных определений. Точность определения растворенного углевода в параллельных опытах $\pm 15\%$, воспроизводимость в независимых определениях $\pm 30\%$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА И РЕДУЦИРУЮЩЕГО САХАРА

Метод основан на разрушении животных белков щелочью, осаждении гликогена этанолом, кислотном гидролизе гликогена и количественном определении глюкозы в присутствии периодата

ОБОРУДОВАНИЕ

Термостат или водяная баня на 100 °С. Пробирки, мерные колбы, пипетки. Микроизмельчитель тканей. Колба вместимостью 50 мл с обратным холодильником и устройством для подогрева 20–100 °С. Установка для фильтрации через бумагу. Роторный испаритель. Мерные колбы вместимостью 100–500 мл. Центрифуга 7000 G. Микробюретка вместимостью 10 мл. Колбы конические Эрленмейера вместимостью 10–250 мл.

РЕАКТИВЫ

Гидроксид натрия хч, 60% водный раствор. Дистиллированная вода. Спирт этиловый ректификованный, 60, 70, 80, 90 и 96% водный раствор. Эфир диэтиловый чда. Соляная кислота хч, концентрированная и 2% раствор. Серная кислота хч, концентрированная, 4 н. раствор, 10% раствор. Гидроксид натрия хч, 60% раствор. Ацетат свинца чда, 30% раствор. Индикаторная бумага рН. Сульфат натрия хч, 1 М раствор.

Периодат 0,01 н. раствор, готовят растворением 0,17 г периодата натрия $\text{Na}_2\text{H}_3\text{IO}_6$ (ММ 272) в мерной колбе вместимостью 500 мл, приливают 200 мл дистиллированной воды и 5 мл 4 н. серной кислоты, встряхивают до полного растворения, фильтруют. Калия йодид хч, 5% раствор. Натрия тиосульфат $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ хч, 0,01 н. раствор. Крахмал чда, готовят смешением 0,5 г крахмала с 10 мл воды и, при перемешивании, с 90 мл кипящей воды.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

3 г измельченного образца мяса смешивают в колбе с 5 мл 60% раствора NaOH и нагревают при 100 °С в течение 45 мин, добавляют 5 мл воды и при перемешивании осаждают гликоген добавлением 40 мл этилового спирта. Для ускорения осаждения в смесь добавляют несколько

капель серной кислоты, образующийся сульфат натрия способствует осаждению гликогена. Смесь выстаивают в течение 24 ч, центрифугируют, отделяют надосадочную жидкость с помощью пипетки. Осадок последовательно промывают по 15 мл 60, 70, 80, 90 и 96% этанолом и эфиром, отделяя жидкость центрифугированием. Остатки эфира удаляют испарением на водяной бане.

К осадку гликогена, добавляют 5 мл горячей дистиллированной воды, нейтрализуют смесь добавлением концентрированной и 2% соляной кислоты, добавляют 30 мл 2% соляной кислоты и гидролизуют гликоген нагреванием смеси при 100 °С в течение 3 ч.

Полученный гидролизат количественно переносят в мерную колбу на 250 мл и доводят объем раствора до метки.

Глюкоза окисляется в кислом растворе периодатом по уравнению:



Избыток периодата и образовавшийся иодат определяются после добавления йодида калия в виде эквивалентного количества йода титрованием раствором тиосульфата:



В колбы вносят 8 мл 0,01 н. раствора периодата, 2 мл исследуемого раствора, содержащего глюкозу и 2 мл 10% раствора серной кислоты. Параллельно ставят холостой опыт с 2 мл воды. Смеси прогревают в течение 15 мин при 100 °С, охлаждают проточной водой, добавляют в каждую колбу по 3 мл 5% раствора KI , титруют выделившийся йод 0,01 н. раствором тиосульфата натрия, добавляя к концу титрования 5 капель 0,5% раствора крахмала в качестве индикатора.

РАСЧЕТ

Содержание редуцирующего сахара (глюкозы) X (мг/100 г мяса, мг%) рассчитывают по формуле:

$$X = 0,927 \cdot 0,18 \cdot (V_1 - V_2) \cdot 250 \cdot 100 / g \cdot V,$$

где: 0,927 — коэффициент пересчета глюкозы в гликоген; 0,18 — количество мг глюкозы, соответствующее 1 мл 0,01 н. раствора тиосульфата; 0,927 — коэффициент пересчета глюкозы в гликоген; $(V_1 - V_2)$ — разность количества 0,01 н. раствора тиосульфата, пошедшего на титрование испытуемой и контрольной пробы, мл; g — навеска образца; V — количество раствора глюкозы, взятое для определения, мл.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов трех параллельных определений. Точность определения

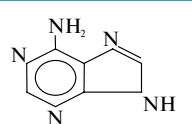
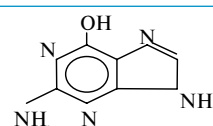
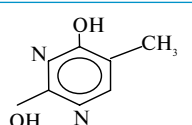
растворенного углевода в параллельных опытах $\pm 20\%$, воспроизводи-
мость в независимых определениях $\pm 40\%$.

8.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

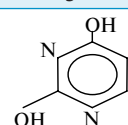
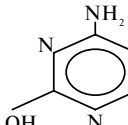
Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) в количестве до 1% входит в состав всех живых клеток и обеспечивает передачу наследственности (генетический код), осуществляя синтез клеточных белков. ДНК обладает структурой двухцепочечного биополимера, состоящего из связанных нуклеотидов и имеет молекулярную массу около 1 млн. Да (табл. 8.14). Считается, что в составе некоторых клеток, например прокариот, вся наследственная информация хранится в одной большой молекуле ДНК с молекулярной массой порядка $2 \cdot 10^9$. В микробных и животных клетках может содержаться несколько больших молекул ДНК. Кольцевые ДНК клеток, называемые плазмидами, используются в качестве «векторов» — трансформируемых биохимических веществ, применяемых в генной инженерии.

Таблица 8.14

Строение нуклеотидов ДНК и РНК

Русское наименование	Английское наименование	Символ		Структурная формула	ММ	Растворимость, г/100 г		
		рус.	англ.			В воде при 20 °С	В воде при 100 °С	В этаноле при 20 °С
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Аденин	Adenine	А	A		131,5	0,09	2,5	MP
Гуанин	Guanine	Г	G		151,1	0,004	3	HP
Тимин	Thymine	Т	T		126,1	0,4	P	MP

Окончание

Русское наименование	Английское наименование	Символ		Структурная формула	ММ	Растворимость, г/100 г		
		рус.	англ.			В воде при 20 °С	В воде при 100 °С	В этаноле при 20 °С
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Урацил	Uracil	У	U		121,1	0,36	P	MP
Цитозин	Cytosine	Ц	C		111,1	0,77	P	MP

Комбинация трех нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты называется кодоном. В соответствии с расшифрованным генетическим кодом такой кодон определяет в живой клетке синтез конкретной аминокислоты. Например UUG (–УУГ–) кодирует образование аминокислоты Leu (табл. 8.15).

Таблица 8.15

Генетический код

	У	Ц	А	Г	
У	Фен	Сер	Тир	Цис	У
	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц
	Лей	Сер	СТОП	СТОП	А
	Лей	Сер	СТОП	Тре	Г
Ц	Лей	Про	Гис	Арг	У
	Лей	Про	Гис	Арг	Ц
	Лей	Про	Глн	Арг	А
	Лей	Про	Глн	Арг	Г
А	Иле	Тре	Асп	Сер	У
	Иле	Тре	Асп	Сер	Ц
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А
	Мет	Тре	Лиз	Арг	Г
Г	Вал	Ала	Асп	Гли	У
	Вал	Ала	Асп	Гли	Ц
	Вал	Ала	Глу	Гли	А
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г

Увеличение содержания нуклеиновых компонентов более 1,5–2% в объектах пищевого назначения, считается небезопасным, поэтому, например, микробный белок, содержащий до 6–8% нуклеиновых компонентов, подвергают до использования в составе животных кормов денуклеинизации.

ВЫДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК МЕТОДОМ ЩЕЛОЧНОГО ЛИЗИСА

Все методы, связанные с выделением и количественным определением компонентов ДНК и РНК связаны, как правило, с разрушением определяемых объектов. Достижения генетической инженерии сегодня, позволяют выделять из клеток микроорганизмов без структурного азрушения плазмиды, представляющие собой кольцевые двухцепочечные ДНК. Они содержат около 4000 пар нуклеотдных фрагментов. С ними проводятосновные генетические манипуляции.

ОБОРУДОВАНИЕ

Аналитические весы. Конические колбы с пробками на 50 мл. Центрифуга на 8000 G. Термометры 0–100 °С. Ультратермостат 0–100 °С. Холодильник со льдом. Размельчитель тканей или микрогомогенизатор.

РЕАКТИВЫ

1. Лизирующий раствор 1: 25 мМ Трис-НСl, рН 8 / 50 мМ глюкозы / 20 мМ ЭДТА / 2 мг/мл лизоцима. Готовят растворением 3 г трис(гидроксиметил)аминометана $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, 9 г глюкозы и 7,45 г этилендиаминтетраацетата динатриевой соли $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ЭДТА) в 0,5 л воды, устанавливают рН раствора равным 8, добавляя концентрированный раствор НСl, растворяют 2 г лизоцима и доводят общий объем раствора до 1 л. Срок хранения в холодильнике не более 7 суток.

2. Лизирующий раствор 2. Растворяют 1 г натрия додецилсульфата $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ (SDS) в 99 мл 0,2 М (8 г/л) раствора NaOH.

3. 3 М раствор натрия ацетата. Растворяют 408 г/л ацетата натрия $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде и устанавливают рН раствора 4,5–5,0, добавлением ледяной CH_3COOH .

4. Этанол 96%-й.

5. Трис-ацетатный буфер. 0,04 М Трис-ацетат / 0,002 М ЭДТА рН 8,0. Готовят растворением 242 г/л Триса, 57,1 мл/л ледяной CH_3COOH до рН 8.

6. 5 М (246 г/л) раствор хлорида лития LiCl, содержащий 0,75 г/л ЭДТА.

ХОД РАБОТЫ

1. Получают суспензию животной ткани клеток, гомогенизируют 1 г мяса с 15 мл воды, центрифугируют при 5000 об/мин, надосадочную жидкость отбрасывают.

2. К осадку добавляют 1 мл лизирующего раствора 1, перемешивают, сразу добавляют 2 мл раствора 2. Смесь центрифугируют, надосадочную жидкость отделяют.

3. К полученной жидкости добавляют 1,5 мл 3 М раствора натрия ацетата, перемешивают до формирования осадка, который отделяют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают.

4. К осадку добавляют 1 мл этанола, перемешивают в течение 10 мин, повторно центрифугируют. Надосадочную жидкость отбрасывают.

5. Осадок растворяют в 2 мл Трис-ацетатного буфера.

6. К раствору добавляют 2 мл 5 М раствора хлорида лития, перемешивают и выдерживают при температуре льда в течение 15 мин. Осадок отделяют центрифугированием.

7. П.п. 4–6 повторяют, к осадку ДНК добавляют 2 мл Трис-ацетатного буфера и используют для количественного определения содержания ДНК в растворе.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК, РНК И ИХ КОМПОНЕНТОВ В ГИДРОЛИЗАТАХ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПО СПИРИНУ

Метод основан на способности ДНК, РНК и продуктов их расщепления (нуклеотидов) поглощать в ультрафиолетовой части спектра при 200–300 нм.

При кислотном гидролизе ДНК и РНК отщепляются фосфаты. Неорганическое содержание фосфора можно рассчитать по разнице поглощения при 270 и 290 нм.

ОБОРУДОВАНИЕ

Спектрофотометр с кюветами, пробирки.

РЕАКТИВЫ

Раствор ДНК. Раствор, содержащий 1 мг чистой ДНК в 1 мл, характеризуется поглощением $D_{260} = 20,0$.

ПРОВЕДЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЯ

В соответствии с инструкцией по эксплуатации подготавливают к работе спектрофотометр. В кювету заливают раствор экстрагированной ДНК и проводят измерение поглощения раствора при 270 и 290 нм против контроля, в качестве которого (2-я кювета сравнения) используют смесь 2 мл 5 М раствора хлорида лития и 2 мл Трис-ацетатного буфера.

РАСЧЕТ

Содержание нуклеинового фосфора (С, мг/мл) ДНК рассчитывают по формуле:

$$C, \text{ мг/мл} = (D_{270} - D_{290}) / 0,19,$$

где D_{270} и D_{290} — поглощение раствора при 270 и 290 нм.

Для того, чтобы перейти от количества фосфора к количеству ДНК, полученное значение содержания фосфора С умножают на 10,1. Для расчета содержания РНК значение С умножают на 10,5, поскольку содержание фосфатов в РНК в среднем составляет 9,5%, а в ДНК — 9,9%.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов трех параллельных определений. Точность определения в параллельных опытах $\pm 20\%$, воспроизводимость в независимых определениях $\pm 50\%$.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ К ГЛАВЕ 8

1. Какие сложности возникают при анализе биологически активных веществ природного происхождения?
2. Почему важно знать содержания аминокислот, углеводов и жирных кислот в природных объектах?
3. Какова точность определения содержания аминокислот, углеводов, ДНК и жирных кислот различными методами?
4. Как согласуется безопасный уровень содержания конкретного вещества и границы диапазона аналитического определения?
5. Каково влияние аппаратного оснащения на точность выполнения аналитических процедур?

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 8

Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия. — М.: Просвещение, 1987. — 815 с.

Паронян, В. Х. Технология и организация производства жиров и жирозаменителей. — М.: Де Ли принт, 2007. — 512 с.

Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. — М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014. — 328 с.

Нестурх, М. Ф. Методы химии белков. — М.: Высшая школа, 2008. — 422 с.

Огнев, С. И. Аминокислоты, пептиды и белки. — М.: Высшая школа, 2005. — 365с.

Глава 9

АНАЛИТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СОДЕРЖАНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЖИВЫХ СИСТЕМ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В СЫРЬЕ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

9.1 АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНОВ

Витамины образуют важную группу органических соединений, выполняющих в живых организмах регуляторную функцию практически всех без исключения протекающих в организме биохимических реакций. Основные витамины, их свойства и потребность в них человека описаны в табл. 9.1–9.3.

Поступление витаминов с пищей является важнейшим фактором нормального здорового питания, а содержание витаминов — существенный показатель питательной и биологической полезности данного вида пищевой продукции.

Анализ количественного содержания витаминов позволяет сравнивать качество продуктов питания по этому показателю. Современные требования к маркировке товаров, особенно в развитых странах, требуют указания на этикетке перечня имеющихся в каждом продукте витаминов и их количественного содержания.

Таблица 9.1

Основные витамины

Русское наименование	Английское наименование	Элементный состав	Молярная масса	Растворимость в воде, г/100 г
Витамин А	Retinoic acid	$C_{20}H_{28}O_2$	300,44	НР
Витамин В ₁	Thiamine hydrochloride	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	337,3	100(Н ₂ О) 0,35(сп.)
Витамин В ₂	Riboflavine	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	376,38	0,01

Окончание

Русское наименование	Английское наименование	Элементный состав	Молярная масса	Растворимость в воде, г/100 г
Витамин В ₆	Pyridoxine hydrochloride	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	135,1	10% (рН 2,5)
Витамин В ₁₂	Cyanocobalamin	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	1355,39	1,2
Витамин С	Ascorbic acid	$C_6H_8O_6$	176,13	100 мг/мл
Витамин D ₂	Calciferol	$C_{28}H_{44}O$	396,66	НР
Витамин Е	D, L-a	$C_{29}H_{50}O_2$	430,72	НР
Витамин РР	Niacin	$C_6H_5NO_2$	123,13	1,5
Никотинамид	Niacinamide	$C_6H_6N_2O$	122,13	100(Н ₂ О) 66(сп.)

Таблица 9.2

Возрастная суточная потребность в витаминах человека в период активного развития

Возраст	А, мг	В ₁ , мг	В ₂ , мг	В ₆ , мг	РР, мг	Е, МЕ	В ₁₂ , мкг	С, мг	D, МЕ	Фолиевая кислота, мг
До 10 лет	0,5	1	1,3	1,3	13	10	1,5	60	100	0,2
До 20 лет	1	1,5	2	2	20	15	3	70	100	0,2

Таблица 9.3

Среднее содержание витаминов в некоторых пищевых продуктах

	Говядина	Рыба	Черная смородина	Мука пшеничная	Капуста	Картофель	Яйцо
Витамин А (β-каротин), мг	Следы	0,02–0,06	0,1	0,006	0,1–0,3	0,02	0,35
Витамин В ₁ (тиамин), мг	0,05–0,1	0,04–0,3	0,03	0,3–0,6	0,05–0,1	0,07	0,07
Витамин В ₂ (рибофлавин), мг	0,15–0,2	0,05–0,2	0,04	0,1–0,5	0,05–0,2	0,07	0,4
Пантотеновая кислота, мг	0,5–0,6	0,2–1,0	0,4	0,5–0,8	0,1–0,4	0,3	1,3
Витамин В ₆ , мг	0,3–0,4	0,08–0,5	0,15	0,2–0,5	0,1–0,3	0,3	0,15
Витамин В ₇ (биотин), мкг	3–3,5	0,8–2	2,4	Следы	1,5–3	0,1	28
Витамин В ₉ (фолаты), мкг	8,4–9,6	6–15	5	40	17–30	8	7
Витамин В ₁₂ , мкг	2,6–3	1,2–4,1	Следы	Следы	Следы	Следы	0,5
Витамин С, мг	Следы	0,1–2	200	Следы	50–120	20	Следы
Витамин Е, мг	0,5–0,6	0,4–1,2	0,7	3–5	0,1–1	0,1	2
Витамин РР (ниацин), мг	4,7–5,5	0,5–3,7	0,3	4–4,5	0,4–0,7	1,3	0,2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА А ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Сущность метода заключается в щелочном гидролизе образца, сопровождающимся высвобождением витамина из клеток и гидролизом его эфиров до свободных форм, экстракции органическим растворителем, очистке экстракта на окиси алюминия и количественном определении методом ВЭЖХ. Учитывая лабильность витаминов определение проводят в максимально короткое время, проводя операции в темноте в присутствии антиоксидантов, предотвращающих окислительное разрушение витамина.

Метод предназначен для анализа содержания витамина А в пищевых продуктах растительного, животного и другого происхождения.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г. Испаритель ротационный. Аппарат для встряхивания типа АБУ-6с. Микроизмельчитель ткани. Термостат с регулируемым нагреванием 20–200 °С. Спектрофотометр, $\lambda = 200–900$ нм. Колбы перегонные вместимостью 50–1000 мл НШ29/32. Колбы конические плоскодонные вместимостью 250–500 мл НШ 29/32. Колбы мерные 2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В-56–80 ХС. Цилиндры мерные 1–50, 1–100, 1–250 с притертой пробкой. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стекланные банки с притертыми крышками, вместимостью 50–1000 см³. Воронки делительные ВД-100–29/32, ВД-250–29/32. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1–10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Бумага фильтровальная лабораторная.

Жидкостной хроматограф с УФ и флуоресцентным детектором типа Biotronic HPLC Eppendorf-Biotronic (Германия) с колонкой ODS-5 мкм, 150 × 4 мм или другой хроматограф аналогичного класса.

Микрошприц для ввода 1–100 мкл пробы заколом через клапан хроматографа. Устройство для фильтрования с фильтром 0,45 мкм.

Баллон стальной для сжатого гелия, номинальное давление 150 ат с редуктором и осушающими насадками с силикагелем.

РЕАКТИВЫ

Спирт этиловый 96% ректификованный. Гидроксид калия хч, 50% раствор. Аскорбиновая кислота (витамин С) фарм., чда. Вода дистиллированная для ВЭЖХ. Эфир диэтиловый чда, профильтрованный

через колонку с оксидом алюминия. Бумага индикаторная универсальная для определения рН. Натрий сульфат безводный, чда, экстрагированный гексаном и просушенный при 150 °С в течение 5 ч. Ацетонитрил, хч, для ВЭЖХ. Метанол хч, для ВЭЖХ. Изопропанол хч, для ВЭЖХ. Хлороформ, хч, перегнанный. Этанол для ВЭЖХ.

Эталоны витамина А (ретинол) гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ГИДРОЛИЗ

Навеску измельченного продукта около 20 г (допускается брать навеску 1–20 г с содержанием витамина 2–25 мкг) помещают в круглодонную колбу, соединенную шлифом с обратным холодильником и добавляют 50 мл этилового спирта и 0,2 г аскорбиновой кислоты. В случае влажности образца менее 10–15% в колбу добавляют 40 мл воды и выстаивают при перемешивании 15 мин. В колбу добавляют 50% раствор КОН 8 мл на 20 г навески при содержании жира < 5%, 20 мл щелочи при содержании жира 5–40% и 30 мл щелочи при жирности > 40%.

Смесь кипятят 0,5 ч с обратным холодильником, охлаждают, переливают в делительную воронку, разбавляют водой до концентрации этанола в смеси около 30%.

После добавления воды смесь должна оставаться прозрачной, если наблюдается помутнение, свидетельствующее о неполном омылении, процесс гидролиза повторяют с новой навеской, увеличив количество щелочи.

ЭКСТРАКЦИЯ

После омыления смесь в делительной воронке экстрагируют диэтиловым эфиром 4 × 30 мл, колбу ополаскивают эфиром. Объединенный эфирный экстракт отмывают от щелочи водой до рН 7–8, добавляют 10 г безводного сульфата натрия, выдерживают 0,5 ч в темном месте и медленно фильтруют раствор через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу промывая посуду эфиром, и отгоняют эфир на роторном испарителе досуха при температуре не выше 25–30 °С. Остаток растворяют в 5 мл гексана с тем, чтобы концентрация витамина А была в пределах 3–5 мкг/мл.

При выпадении осадка после растворения в гексане, смесь выдерживают в течение 2 ч при 4 °С и осадок отфильтровывают.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА

Навеску стандарта в количестве 0,02 г витамина А или витамина А ацетата растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ в 80 мл этанола и доводят объем раствора до метки, получая основной стандартный раствор с концентрацией витамина А 0,2 мг/мл.

2 мл полученного основного стандартного раствора витамина А переносят в колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем раствора этанолом до метки, получая основной рабочий стандартный раствор с концентрацией витамина А 4 мкг/мл (13 МЕ/мл).

Срок хранения стандартного раствора при 4 °С — 10 дней. В день использования стандартного раствора его концентрацию проверяют, измеряя оптическую плотность стандартного раствора витамина А на спектрофотометре при $\lambda = 325$ нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Содержание витамина А в растворе (X, мкг/см³) рассчитывают по формуле:

$$X = 10000 \cdot D / E^{1\%}_{1\text{см}},$$

где: D — оптическая плотность раствора при $\lambda = 325$ нм против этилового спирта, 10000 — содержание витамина в 1 см³ 1%-ного раствора, мкг; $E^{1\%}_{1\text{см}}$ — коэффициент экстинции, равный для витамина А 1830.

Содержание в растворе в пересчете на витамин А (ретинол) проводят по формуле: $X = 10000 \cdot D \cdot 0,87 / E^{1\%}_{1\text{см}}$, где: D — оптическая плотность раствора при $\lambda = 325$ нм против этилового спирта, 10000 — содержание витамина в 1 см³ 1%-ного раствора, мкг; $E^{1\%}_{1\text{см}}$ — коэффициент экстинции, равный для витамина А ацетата 1550; 0,87 — коэффициент пересчета на ретинол. При использовании в качестве стандарта витамина А ацетата, к одной из двух навесок образца исследуемого продукта добавляют точный объем стандартного раствора витамина А ацетата и подвергают щелочному гидролизу как указано выше для подготовки проб к определению, проводя аналогичные разбавления как и для пробы без внутреннего стандарта. Рекомендуемая концентрация витамина А в испытуемом растворе должна составлять около 3 мкг/мл, а в растворе с добавленным внутренним стандартом — около 5 мкг/мл.

ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ МЕТОДОМ ВЭЖХ.

ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В подготовленный к работе в соответствии с инструкцией по эксплуатации хроматограф вводят 10–100 мкл пробы.

Элюент — 98% водный раствор метанола или 95% водный раствор ацетонитрила, скорость подачи элюента 0,1–1 мл/мин.

Колонки типа Силасорб С18 (62 × 2 мм), Nucleosil C18 (250 × 4,6 мм), Ultrasphere ODS (250 × 4,6 мм) промывают через каждые 100 определений 10 мл смеси этанол-хлороформ (1:1) или метанол-хлороформ (1:1), затем 5 мл метанола.

Определение проводят с использованием ультрафиолетового детектора (при $\lambda = 325$ нм) или флуориметрического детектора (при $\lambda_1 = 325$ нм, $\lambda_2 = 480$ нм).

Время выхода пика ретинола составляет 3–5 мин. Сокращение времени выхода основного пика можно проводить последовательным увеличением на 1% количества метанола или ацетонитрила. Увеличение времени выхода пика регулируют увеличением содержания воды.

НОРМАЛЬНО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В подготовленный к работе в соответствии с инструкцией по эксплуатации хроматограф вводят 10–100 мкл пробы.

Элюент — гексан или гептан с 1–1,5% изопропанола или 0,5–1% метанола, скорость подачи элюента 0,1–1 мл/мин.

Колонки типа Силасорб, Партисил, Зорбакс промывают через каждые 100 определений 10 мл смеси метанол-хлороформ (1:1), затем 5 мл гексана.

Определение проводят с использованием ультрафиолетового детектора (при $\lambda = 325$ нм) или флуориметрического детектора (при $\lambda_1 = 325$ нм, $\lambda_2 = 480$ нм).

Время выхода пика ретинола составляет 8–15 мин. Сокращение времени выхода основного пика можно проводить последовательным увеличением на 1% количества метанола. Увеличение времени выхода пика регулируют увеличением содержания гексана.

РАСЧЕТ

Содержание витамина А в продукте (ХА, мг/100 г) рассчитывают с использованием автоматической программы обсчета хроматографических данных по формуле:

$$ХА = S_x \cdot C_{\text{ст}} \cdot V_1 \cdot 100 / S_{\text{ст}} \cdot V_2 \cdot g \cdot 1000,$$

где: S_x — площадь (высота) пика витамина на хроматограмме пробы испытуемого раствора, мм², условных машинных единиц или мм; $C_{\text{ст}}$ — количество витамина в растворе стандарта, введенного на колонку, мкг; V_1 — общий объем испытуемого раствора, мл; $S_{\text{ст}}$ — площадь (высота) пика витамина на хроматограмме пробы стандартного раствора, мм², условных машинных единиц или мм; V_2 — объем испытуемого раствора, вводимый в колонку хроматографа, мл (V_1 / V_2 — разбавление раствора); g — навеска образца, взятого для анализа, г; 100 — пересчет на 100 г пищевого продукта; 1000 — пересчет на мг.

При использовании внутреннего стандарта витамина А ацетата расчет проводят по формуле:

$$X_A = S_x \cdot C_{ст2} \cdot V_1 \cdot 100 / (S - S_{ст}) \cdot V_2 \cdot g \cdot 1000,$$

где: S — площадь (высота) пика витамина А пробы + внесенного витамина, мм², условных машинных единиц или мм; C_{ст2} — количество витамина А в образце с внесенным витамином А ацетатом, введенного на колонку, мкг.

Результаты определений рассчитывают до третьей значащей цифры и округляют до второго знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому при P = 0,95. (При независимом определении 30%).

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания витамина любой пробы при допускаемых методом изменениях влияющих факторов ± 0,1X.

Минимальный уровень обнаружения по витамину А составляет для флуоресцентного детектора 1 нг в пробе, для УФ-детектора 0,01 мкг (10 нг) во вводимой в хроматограф пробе (20 мкл) пробе, что соответствует 0,5 нг/мкл для УФ-детектора и 0,05 нг/мкл для флуоресцентного детектора при степени извлечения витамина из пробы 75–90%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА Е ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Сущность метода заключается в щелочном гидролизе образца, сопровождающимся высвобождением витамина из клеток и гидролизом его эфиров до свободных форм, экстракции органическим растворителем, очистке экстракта и количественном определении методом ВЭЖХ. Учитывая лабильность витаминов, определение проводят в максимально короткое время, проводя операции в темноте в присутствии антиоксидантов, предотвращающих окислительное разрушение витамина.

Метод предназначен для анализа содержания витамина Е в пищевых продуктах растительного, животного и другого происхождения.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с точностью взвешивания 0,0002 г. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного

класса. Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с. Микроизмельчитель ткани. Термостат с регулируемым нагреванием 20–200 °С. Спектрофотометр, λ 200–900 нм.

Колбы перегонные вместимостью 50–1000 мл НШ29/32. Колбы конические плоскодонные вместимостью 250–500 мл НШ 29/32. Колбы мерные 2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В-56–80 ХС. Цилиндры мерные 1–50, 1–100, 1–250 с притертой пробкой. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стекланные банки с притертыми крышками, вместимостью 50–1000 см³. Воронки делительные ВД-100–29/32, ВД-250–29/32. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1–10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Бумага фильтровальная.

Жидкостной хроматограф с УФ и флуоресцентным детектором типа Biotronic HPLC Eppendorf-Biotronic (Германия) с колонкой ODS-5 мкм, 150 × 4 мм или другой хроматограф аналогичного класса.

Микрошприц для ввода 1–100 мкл пробы забором через клапан хроматографа. Устройство для фильтрования с фильтром 0,45 мкм.

Баллон стальной для сжатого гелия, номинальное давление 150 ат с редуктором и осушающими насадками с силикагелем.

РЕАКТИВЫ

Спирт этиловый 96% ректификованный. Гидроксид калия хч, 50% раствор. Аскорбиновая кислота (витамин С) фарм., чда. Вода дистиллированная для ВЭЖХ. Эфир диэтиловый чда, профильтрованный через колонку с оксидом алюминия. Бумага индикаторная универсальная для определения рН. Натрий сульфат безводный, чда, экстрагированный гексаном и просушенный при 150 °С в течение 5 ч. Ацетонитрил хч для ВЭЖХ. Метанол хч для ВЭЖХ. Изопропанол хч для ВЭЖХ. Хлороформ хч, перегнанный. Этанол для ВЭЖХ. Этанол абсолютный, чда.

Эталоны витамина Е (α, β, γ, δ-токоферолы, токотриенолы или их ацетаты) гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ. ЩЕЛОЧНОЙ ГИДРОЛИЗ

Навеску измельченного продукта около 15 г (допускается брать навеску 1–15 г с содержанием витамина 20–100 мкг) помещают в круглодонную колбу, соединенную шлифом с обратным холодильником и до-

бавляют 50 мл этилового спирта и 0,2 г аскорбиновой кислоты. В случае влажности образца менее 10–15% в колбу добавляют 40 мл воды и выстаивают при перемешивании 15 мин. В колбу добавляют 50% раствор КОН 8 мл на 20 г навески при содержании жира <5%, 20 мл щелочи при содержании жира 5–40% и 30 мл щелочи при жирности >40%.

Смесь кипятят 0,5 ч с обратным холодильником, охлаждают, переливают в делительную воронку, разбавляют водой до концентрации этанола в смеси около 30%. После добавления воды смесь должна оставаться прозрачной, если наблюдается помутнение, свидетельствующее о неполном омылении, процесс гидролиза повторяют с новой навеской, увеличив количество щелочи.

ЭКСТРАКЦИЯ

После омыления смесь в делительной воронке экстрагируют диэтиловым эфиром 4 × 30 мл, колбу ополаскивают эфиром. Объединенный эфирный экстракт отмывают от щелочи водой до pH 7.0–8.0, добавляют 10 г безводного сульфата натрия, выдерживают 0,5 ч в темном месте и медленно фильтруют раствор через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу промывая посуду эфиром, и отгоняют эфир на роторном испарителе досуха при температуре не выше 25–30 °С. Остаток растворяют в 5 мл гексана с тем, чтобы концентрация витамина Е была в пределах 3–5 мкг/мл.

При выпадении осадка после растворения в гексане, смесь выдерживают в течение 2 ч при 4 °С и осадок отфильтровывают.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА

Навеску стандарта массой 0,04 г α-токоферола растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ в 80 мл этанола и доводят объем раствора до метки, получая основной стандартный раствор с концентрацией α-токоферола 0,4 мг/мл. Срок хранения стандартного раствора при 4 °С — 10 дней.

5 мл полученного основного стандартного раствора α-токоферола переносят в колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем раствора этанолом до метки, получая основной рабочий стандартный раствор с концентрацией витамина 20 мкг/мл.

Срок хранения стандартного раствора при 4 °С — 10 дней. При использовании в качестве стандарта α-токоферола ацетата его гидролизуют в щелочной среде. Навеску 0,04 г α-токоферола ацетата растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ в 80 мл этанола и дово-

дят объем раствора до метки. 5 мл полученного раствора смешивают с 15 мл этанола, 0,1 г аскорбиновой кислоты, 1 мл 50%-ного раствора КОН, кипятят 20 мин на водяной бане с обратным холодильником и экстрагируют.

Для этого после омыления смесь в делительной воронке экстрагируют диэтиловым эфиром 4 × 30 мл, колбу ополаскивают эфиром. Объединенный эфирный экстракт отмывают от щелочи водой до pH 7–8, добавляют 10 г безводного сульфата натрия, выдерживают 0,5 ч в темном месте и медленно фильтруют раствор через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу промывая посуду эфиром, и отгоняют эфир на роторном испарителе досуха при температуре не выше 25–30 °С. Остаток растворяют в 100 мл абсолютного этанола с тем, чтобы концентрация α-токоферола была около 20 мкг/мл.

В день использования стандартного раствора его концентрацию проверяют, измеряя оптическую плотность стандартного раствора α-токоферола на спектрофотометре при λ = 292 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Содержание α-токоферола в растворе (X, мкг/мл) рассчитывают по формуле: $X = 10000 \cdot D / E^{1\%}_{1\text{см}}$, где D — оптическая плотность раствора при λ = 292 нм против этилового спирта, 10000 — содержание витамина в 1 см³ 1%-ного раствора, мкг; $E^{1\%}_{1\text{см}}$ — коэффициент экстинкции, равный для α-токоферола 74,7. В рабочем стандартном растворе содержание α-токоферола должно быть около 20 мкг/мл.

ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ МЕТОДОМ ВЭЖХ.

ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В подготовленный к работе в соответствии с техинструкцией по эксплуатации хроматограф вводят 10–100 мкл пробы.

Элюент — 98% водный раствор метанола или 95% водный раствор ацетонитрила, скорость подачи элюента 0,1–1 мл/мин.

Колонки типа Силасорб С18 (62 × 2 мм), Nucleosil С18 (250 × 4,6 мм), Ultrasphere ODS (250 × 4,6мм) промывают через каждые 100 определений 10 мл смеси этанол-хлороформ (1:1) или метанол-хлороформ (1:1), затем 5 мл метанола.

Определение проводят с использованием ультрафиолетового детектора (при λ = 292 нм) или флуориметрического детектора (при λ₁ = 292 нм, λ₂ = 326 нм).

Время выхода пика α-токоферола составляет 9–15 мин. Сокращение времени выхода основного пика можно проводить последовательным увеличением на 1% количества метанола или ацетонитрила. Увеличение времени выхода пика регулируют увеличением содержания воды.

НОРМАЛЬНО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В подготовленный к работе в соответствии с инструкцией по эксплуатации хроматограф вводят 10–100 мкл пробы.

Элюент — гексан или гептан с 1–1,5% изопропанола или 0,5–1% метанола, скорость подачи элюента 0,1–1 мл/мин.

Колонки типа Силасорб, Партисил, Зорбакс промывают через каждые 100 определений 10 мл смеси метанол-хлороформ (1:1), затем 5 мл гексана.

Определение проводят с использованием ультрафиолетового детектора (при $\lambda = 292$ нм) или флуориметрического детектора (при $\lambda_1 = 292$ нм, $\lambda_2 = 326$ нм).

Время выхода пика α -токоферола составляет 3–5 мин. Сокращение времени выхода основного пика можно проводить последовательным увеличением на 1% количества метанола. Увеличение времени выхода пика регулируют увеличением содержания гексана.

При наличии в экстракте ретинола (витамина А) необходимо пропускать через колонку элюент до полного выхода пика ретинола во избежание интерференции пиков при последующем заколе.

В хроматограф вводят испытываемую пробу и такое же количество стандартного раствора.

РАСЧЕТ

Содержание α -токоферола в продукте (ХА, мг/100г) рассчитывают с использованием автоматической программы обесчета хроматографических данных по формуле:

$$XA = S_x \cdot C_{ст} \cdot V_1 \cdot 100 / S_{ст} \cdot V_2 \cdot g \cdot 1000,$$

где: S_x — площадь (высота) пика витамина на хроматограмме пробы испытываемого раствора, мм², условных машинных единиц или мм; $C_{ст}$ — количество витамина в растворе стандарта, введенного на колонку, мкг; V_1 — общий объем испытываемого раствора, мл; $S_{ст}$ — площадь (высота) пика витамина на хроматограмме пробы стандартного раствора, мм², условных машинных единиц или мм; V_2 — объем испытываемого раствора, вводимый в колонку хроматографа, мл (V_1 / V_2 — разбавление раствора); g — навеска образца, взятого для анализа, г; 100 — пересчет на 100 г пищевого продукта; 1000 — пересчет на мг.

При использовании внутреннего стандарта расчет проводят по формуле:

$$XA = S_x \cdot C_{ст2} \cdot V_1 \cdot 100 / (S - S_{ст}) \cdot V_2 \cdot g \cdot 1000,$$

где: S — площадь (высота) пика α -токоферола пробы + внесенного витамина, мм², условных машинных единиц или мм; $C_{ст2}$ — количество витамина В в образце с внесенным стандартом, введенного на колонку, мкг.

Результаты определений рассчитывают до третьей значащей цифры и округляют до второго знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (Х) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 25% по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$. (При независимом определении 50%).

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания витамина любой пробы при допускаемых методом изменения влияющих факторов $\pm 0,125X$.

Минимальный уровень обнаружения по α -токоферолу составляет для флуоресцентного детектора 5 нг в пробе, для УФ-детектора 0,05 мкг (50 нг) во вводимой в хроматограф пробе (20 мкл) пробе, что соответствует 2,5 нг/мкл для УФ-детектора и 0,25 нг/мкл для флуоресцентного детектора при степени извлечения витамина из пробы 75–90%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА В₁ ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Сущность метода заключается в высвобождении связанных форм витамина В₁ (тиамина) ферментативным и кислотным гидролизом образца, очистке гидролизата и количественном переводе тиамин в тиохром в щелочной среде, экстракции тиохрома и измерении интенсивности флуоресценции тиохрома в сравнении со стандартом на флуориметре.

Метод предназначен для анализа содержания витамина В₁ в пищевых продуктах растительного, животного и другого происхождения.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с точностью взвешивания 0,0002 г. Термостат с регулируемым нагреванием 20–200 °С. Гомогенизатор типа микроразмельчителя тканей РТ-2. рН-метр с точностью измерения $\pm 0,02$ ед. рН. Флуориметр лабораторный типа ЭФ-3МА или аналогичный, обеспечивающий длины волн возбуждения в области 360–390 нм и флуоресценции $\lambda = 400$ –450 нм. Центрифуга. Эксикатор. Колонки хроматографические с нижней пористой перегородкой (30 × 1 см) и рубашкой для обогрева при температуре теплоносителя — воды 60–80 °С.

Колбы перегонные вместимостью 50–1000 мл НШ29/32. Колбы конические плоскодонные вместимостью 250–500 мл НШ 29/32. Колбы мерные 2–50–2; 2–500–2; 2–1000–2. Воронка В-56–80 ХС.

Цилиндры мерные 1–50, 1–100, 1–250 с притертой пробкой. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стеклянные банки с притертыми крышками, вместимостью 50–1000 см³. Воронки делительные ВД-100–29/32, ВД-250–29/32. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1–10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Бумага фильтровальная лабораторная. Индикаторная бумага рН.

РЕАКТИВЫ

Амилоризин П10Х или пектаваморин П10Х. Кислота соляная, хч, 0,1 М и 2 М раствор. Кислота серная хч. Спирт изобутиловый или бутиловый чда или хч. Толуол хч. Ацетат натрия $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ хч, насыщенный раствор с концентрацией >48 г/100 г воды. Спирт этиловый 96% ректификованный. Калия ферроцианид (III) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1% раствор со сроком хранения в темной склянке <2 суток. Катионит КРС3пТ-40 (сульфокатионит на основе сополимера стирола и бутадиена с 3% дивинилбензола, емкостью 4,8–5,2 мэкв/г) или СДВ ЗТ-40 с частицами 0,5–1 мм. Калия хлорид хч, 0,25 г/мл раствор в 0,1 М растворе HCl. Уголь активированный. Вода дистиллированная. Натрия гидроксид хч, 0,3 г/мл и 0,1 г/мл водный раствор. Аммиак водный хч, 0,25 г/мл водный раствор. Уксусная кислота хч, 0,03 г/мл водный раствор.

Эталон тиамин гидрохлорида хч или по ФС 42–2413–85 с гарантированной степенью чистоты и содержанием основного вещества не менее 95%.

ПОДГОТОВКА К ОПРЕДЕЛЕНИЮ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА ВИТАМИНА В₁

Навеску 0,1 г тиамин гидрохлорида, предварительно подсушенного в вакууме при 70 °С в течение 3 ч или в эксикаторе над концентрированной серной кислотой в течение 24 ч, переносят в колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем раствора водой до метки, получая основной стандартный раствор с концентрацией витамина 100 мкг/мл. В колбу добавляют 0,5 мл толуола и помещают в склянку из темного стекла. Срок хранения основного стандартного раствора при 4 °С — 2 мес.

1 мл полученного основного стандартного раствора тиамин гидрохлорида переносят в колбу вместимостью 500 см³ и доводят объем раствора водой до метки, получая основной рабочий стандартный раствор с концентрацией витамина 0,2 мкг/мл. Раствор готовят в день проведения анализа.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СМЕСИ

3 мл 1%-ного раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ смешивают с 10 мл 0,3 г/мл раствора NaOH. Смесь пригодна к использованию в течение 3 ч.

ОЧИСТКА СПИРТОВ

Используемые бутиловый или изобутиловый спирты не должны давать флуоресценцию в сравнении с дистиллированной водой. Для очистки спирта к 1 л изобутанола прибавляют 20 г активированного угля, перемешивают 30 мин, выстаивают смесь в течение 24 ч, отделяют уголь фильтрованием через бумагу и перегоняют растворители, отбирая фракции с $T_{\text{к}}$ 117 °С (бутанол) и 108 °С (изобутанол).

СПИРТОВЫЙ РАСТВОР АММИАКА

Готовят, смешивая 12 мл водного раствора аммиака с концентрацией 0,25 г/мл в мерной колбе вместимостью 100 см³ с 70%-ным этанолом, доводя объем раствора до метки 70%-ным этанолом.

ПОДГОТОВКА КОЛОНКИ

Катионит заливают водой, выдерживают смесь в течение >6 ч, суспензию набухшего катионита переливают в колонку, заполненную наполовину водой. Позволяя частицам сорбента осесть на дно, прибавляют сорбент и воду таким образом, чтобы без пузырей сформировать на дне колонки под слоем воды слой катионита высотой около 10 см. Через катионит пропускают 20 мл 0,03 г/мл раствора уксусной кислоты при температуре 70 °С для его перевода в H^+ -форму. Регенерацию катионита проводят обработкой 30 мл спиртового раствора аммиака, нагретого до температуры кипения, затем промывают водой, 0,1 г/мл раствором NaOH, оставляя сорбент в контакте со щелочью в течение 20 мин, промывают водой до нейтральной реакции промывных вод и через катионит пропускают 20 мл 0,03 г/мл раствора уксусной кислоты при температуре 70 °С для его перевода в H^+ -форму. Для определения готовят две колонки.

ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

ГИДРОЛИЗ

Навеску анализируемого измельченного продукта в количестве 20 г (предполагаемое содержание В₁ составляет 0,2 мг/100 г продукта)

помещают в колбу вместимостью 250 см³, приливают 150 мл 0,1 М раствора HCl. Массу навески выбирают, чтобы в гидролизате концентрация тиамин составляла 0,1–0,5 мкг/мл.

Гидролизуют смесь кипячением на водяной бане в течение 40 мин с обратным холодильником, смесь охлаждают до комнатной температуры и устанавливают рН гидролизата потенциометрически до рН 4,5 прибавлением насыщенного водного раствора ацетата натрия.

К нейтрализованному гидролизату добавляют 0,1 г амилоризина и выдерживают в течение 15 ч при температуре 37 °С (для продуктов с высоким содержанием пектинов используют пектаваморин П10Х), гидролизат охлаждают, доводят его объем до 250 мл и фильтруют через бумагу.

ОЧИСТКА ГИДРОЛИЗАТА

Весь фильтрат пропускают через колонку с катионитом в Н⁺–форме (около 10 мл сорбента) со скоростью 15 капель в мин (0,5 мл/мин). Адсорбент с сорбированным тиамин промывают дистиллированной водой. Элюцию проводят 20 мл горячего раствора хлорида калия с концентрацией KCl 0,25 г/мл в 0,1 М растворе HCl при температуре 70 °С. 20 мл элюата собирают в мерные цилиндры.

Через другую колонку с катионитом в Н⁺–форме (около 10 мл сорбента) со скоростью 15 капель в мин (0,5 мл/мин) пропускают 20 мл стандартного рабочего раствора тиамин с концентрацией 0,2 мкг/мл. Адсорбент с сорбированным тиамин промывают дистиллированной водой. Элюцию проводят 20 мл горячего раствора хлорида калия с концентрацией KCl 0,25 г/мл в 0,1 М растворе HCl при температуре 70 °С. 20 мл элюата собирают в мерные цилиндры.

ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА В ТИОХРОМ

В три конические колбы или пробирки с притертыми пробками отмеривают по 5 мл элюата анализируемой пробы, затем в две из них добавляют по 1,2 мл окислительной смеси, а в третью вносят 1,2 мл раствора гидроксида натрия с концентрацией NaOH 0,3 г/мл (контроль). Все колбы энергично встряхивают, прибавляют по 10 мл очищенного изобутанола и встряхивают в течение 1 мин для извлечения тиохрома. Водный и спиртовый (верхний) слои разделяют отстаиванием в темноте или центрифугируют. Верхний спиртовый слой сливают в кюветы или пробирки для измерения интенсивности флуоресценции.

Аналогично поступают с элюатом, полученным после пропускания через колонку рабочего стандартного раствора тиамин.

ИЗМЕРЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Интенсивность флуоресценции тиохрома измеряют при длине волны возбуждения 360–390 нм и флуоресценции 400–450 нм, начиная с проб стандартного раствора тиамин.

РАСЧЕТ

Содержание витамина В₁ (X, мг/100 г продукта) вычисляют по формуле:

$$X = (A - A_1) \cdot C_{\text{ст}} \cdot V_1 / (B - B_1) \cdot V_2 \cdot g \cdot 10,$$

где A — среднее показание флуориметра для испытуемой пробы, условных единиц (делений) прибора; A₁ — показание флуориметра для контроля испытуемой пробы, условных единиц (делений) прибора; B — показание флуориметра для стандартного раствора тиамин, условных единиц (делений) прибора; B₁ — показание флуориметра для контроля стандартного раствора тиамин, условных единиц (делений) прибора; C_{ст} — количество витамина во взятом для окисления тиамин в тиохром объеме стандартного раствора, мкг; V₁ — общий объем испытуемого раствора гидролизата, мл; V₂ — объем испытуемого раствора, взятого для окисления тиамин в тиохром, мл (V₁ / V₂ — разбавление раствора); g — навеска образца, взятого для анализа, г; 10 — пересчет из мкг/г в мг/100 г пищевого продукта.

Результаты определений рассчитывают до третьей значащей цифры и округляют до второго знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 25% по отношению к среднему арифметическому при p = 0,95. (При независимом определении 55%).

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания витамина любой пробы при допускаемых методом изменения влияющих факторов ± 0,125X.

Минимальный уровень флуориметрического обнаружения тиамин составляет 0,5 мкг в флуориметрируемом объеме 10 мл спирта), что соответствует 50 нг/мл при степени извлечения витамина из пробы >75–85%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА В₂ ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Сущность метода заключается в высвобождении связанных форм витамина В₂ (рибофлавина) ферментативным и кислотным гидролизом образца, очистке гидролизата и измерении интенсивности флуо-

ресценции рибофлавина до и после восстановления гидросульфитом натрия в сравнении со стандартом на флуориметре.

Метод предназначен для анализа содержания витамина В₂ в пищевых продуктах растительного, животного и другого происхождения.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с точностью взвешивания 0,0002 г. Термостат с регулируемым нагреванием 20–200 °С. Гомогенизатор типа микроразмельчителя тканей РТ-2. рН–метр с точностью измерения ± 0,02 ед. рН. Флуориметр лабораторный типа ЭФ-3МА или аналогичный, обеспечивающий длины волн возбуждения в области 350–480 нм и флуоресценции λ = 475–650 нм. Центрифуга. Экзикатор. Водяная баня или термостат на 20–120 °С. Секундомер.

Колбы перегонные вместимостью 50–1000 мл НШ29/32. Колбы конические плоскодонные вместимостью 250–500 мл НШ 29/32. Колбы мерные 2–50–2; 2–500–2; 2–1000–2. Воронка В-56–80 ХС. Цилиндры мерные 1–50, 1–100, 1–250 с притертой пробкой. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стеклобанки с притертыми крышками, вместимостью 50–1000 см³. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1–10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Бумага фильтровальная лабораторная. Индикаторная бумага рН.

РЕАКТИВЫ

Кислота серная хч, 0,3 г/мл раствор. Кислота соляная, хч, 0,1 М раствор. Кислота уксусная ледяная, хч. Натрия сульфат безводный хч. Ацетат натрия CH₃COONa·3H₂O хч, насыщенный раствор с концентрацией > 48 г/100 г воды. Натрия гидроксид хч, 0,7 моль/л водный раствор. Калия перманганат чда, 0,03 г/мл водный раствор со сроком хранения 1 нед. Водорода пероксид Н₂О₂ хч, 0,03 г/мл водный раствор со сроком хранения 1 нед. Хлороформ хч. Толуол чда. Амилоризин П10Х. Дистиллированная вода. Натрия гидросульфит хч.

Эталон рибофлавина хч или по ГФ СССР X ст. 585 с гарантированной степенью чистоты и содержанием основного вещества не менее 95%.

ПОДГОТОВКА К ОПРЕДЕЛЕНИЮ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА ВИТАМИНА В₂

Навеску 0,02 г рибофлавина, предварительно подсушенного в эксикаторе над концентрированной серной кислотой в течение 24 ч, переносят в колбу вместимостью 1000 см³ добавляют 750 мл воды и 1 мл

ледяной уксусной кислоты, смесь подогревают для полного растворения, охлаждают раствор до комнатной температуры и доводят объем раствора водой до метки, получая основной стандартный раствор с концентрацией витамина 20 мкг/мл. Раствор помещают в склянку из темного стекла. Срок хранения основного стандартного раствора при 4 °С — 1 мес.

5 мл полученного основного стандартного раствора рибофлавина переносят в колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем раствора водой до метки, получая основной рабочий стандартный раствор с концентрацией витамина 1 мкг/мл. Раствор готовят в день проведения анализа.

ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

ГИДРОЛИЗ

Навеску измельченного продукта в количестве 20 г (предполагаемое содержание В₂ составляет 0,2 мг в 100 г продукта) помещают в колбу вместимостью 250 см³, приливают 150 мл 0,1 М раствора НСl. Массу навески выбирают такой, чтобы в гидролизате концентрация витамина составляла 0,04–0,2 мкг/мл.

Гидролизуют смесь кипячением на водяной бане в течение 40 мин с обратным холодильником, смесь охлаждают до комнатной температуры и устанавливают рН гидролизата потенциметрически до рН 4,5 прибавлением насыщенного водного раствора ацетата натрия.

К нейтрализованному гидролизату добавляют 0,1 г амилоризина и выдерживают в течение 15 ч при температуре 37 °С (для продуктов с высоким содержанием пектинов используют пектаваморин П10Х), гидролизат охлаждают, доводят его объем до 250 мл и фильтруют через бумагу.

Одновременно проводят обработку холостой пробы, взяв вместо 20 г навески образца 20 мл воды.

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

В четыре флуориметрические пробирки с притертыми пробками отмеривают по 10 мл фильтрата анализируемой пробы. В две пробирки с фильтратом добавляют по 1 мл воды, в две другие добавляют по 1 мл рабочего стандартного раствора рибофлавина, в пятую пробирку приливают 10 мл фильтрата контрольной пробы и 1 мл дистиллированной воды.

Во все пробирки добавляют по 1 мл ледяной уксусной кислоты и перемешивают содержимое. Вносят по 0,5 мл 0,03 г/мл водного раствора КМnO₄ и выдерживают в течение 2 мин. В каждую пробирку

прибавляют по 0,5 мл 0,03 г/мл раствора пероксида водорода и энергично встряхивают для удаления избытка кислорода.

ИЗМЕРЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Интенсивность флуоресценции рибофлавина измеряют при длине волны возбуждения 350–480 нм и флуоресценции 475–650 нм, начиная с проб стандартного раствора витамина. После этого в каждую пробирку вносят по 25 мг натрия гидросульфита, перемешивают и вновь проводят измерение. Эту операцию повторяют до установления наименьшей интенсивности флуоресценции.

РАСЧЕТ

Содержание витамина В₂ (X, мг/100 г продукта) вычисляют по формуле:

$$X = [(A - A^1) - (C - S^1)] \cdot C_{ст} \cdot V_1 / [(B - B^1) - (A - A^1)] \cdot V_2 \cdot g \cdot 10,$$

где: А — среднее показание флуориметра для испытуемой пробы без добавления стандартного раствора рибофлавина, условных единиц (делений) прибора; А¹ — показание флуориметра после восстановления рибофлавина гидросульфитом натрия, условных единиц (делений) прибора; В — среднее показание флуориметра для испытуемой пробы с добавлением стандартного раствора рибофлавина, условных единиц (делений) прибора; В¹ — среднее показание флуориметра для испытуемой пробы с добавлением стандартного раствора рибофлавина после восстановления рибофлавина гидросульфитом натрия, условных единиц (делений) прибора; С — показание флуориметра для контрольного опыта на реактивы, условных единиц (делений) прибора; С¹ — показание флуориметра для контрольного опыта на реактивы после восстановления рибофлавина гидросульфитом натрия, условных единиц (делений) прибора; С_{ст} — количество витамина во взятом для окисления объеме стандартного раствора, мкг; V₁ — общий объем испытуемого раствора гидролизата, мл; V₂ — объем испытуемого раствора, взятого для окисления, мл (V₁ / V₂ — разбавление раствора); g — навеска образца, взятого для анализа, г; 10 — пересчет из мкг/г в мг/100 г пищевого продукта.

Результаты определений рассчитывают до третьей значащей цифры и округляют до второго знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 30% по отношению к среднему арифметическому при p = 0,95. (При независимом определении 50%).

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания витамина любой пробы при допускаемых методом изменения влияющих факторов ± 0,15X.

Минимальный уровень флуориметрического обнаружения рибофлавина составляет 0,02 мкг в флуориметрируемом объеме, что соответствует 0,02 мкг/мл при степени извлечения витамина из пробы >75–85%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА РР КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Сущность метода заключается в высвобождении связанных форм витамина РР (ниацина) гидролизом образца, очистке гидролизата от интерферирующих примесей, получении производного глутаконового альдегида и измерении интенсивности поглощения ниацина при 400–425 нм против стандарта.

Метод предназначен для анализа содержания витамина РР в пищевых продуктах растительного, животного и другого происхождения.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с точностью взвешивания 0,0002 г. Термостат с регулируемым нагреванием 20–200 °С. Гомогенизатор типа микроразмельчителя тканей РТ-2. Колориметр фотоэлектрический или спектрофотометр для измерения при λ = 400–425 нм. Центрифуга. Эксикатор. Водяная баня или термостат на 20–120 °С. Автоклав. Секундомер.

Колбы перегонные вместимостью 50–1000 мл НШ29/32. Колбы конические плоскодонные вместимостью 250–500 мл НШ 29/32. Колбы мерные 2–50–2; 2–500–2; 2–1000–2. Воронка В-56–80 ХС. Цилиндры мерные 1–50, 1–100, 1–250 с притертой пробкой. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 25 см³. Стеклянные банки с притертыми крышками, вместимостью 50–1000 см³. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1–10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Бумага фильтровальная лабораторная. Индикаторная бумага рН. Воронка для горячего фильтрования. Воронка Бюхнера с колбой Бунзена.

РЕАКТИВЫ

Кислота серная хч, 0,05; 1 и 2,5 моль/л раствор. Кислота соляная, хч, 0,5 М раствор. Натрия гидроксид хч, 4 и 10 моль/л водный раствор.

Бром хч. Роданид калия хч, 100 г/л и 10 г/л водный раствор. Карбонат кальция хч. Оксид кальция хч. Метол перекристаллизованный 80 г/л раствор в 0,5 М HCl. Спирт этиловый ректификованный, чда. Цинка сульфат хч, раствор 800 г/л. Толуол чда. Фенолфталеин чда, 1% спиртовый раствор. Уголь активированный. Фильтры обеззолненные. Дистиллированная вода.

Эталон кислота никотиновая хч или по Фармакопейной статье с гарантированной степенью чистоты и содержанием основного вещества не менее 95%.

ПОДГОТОВКА К ОПРЕДЕЛЕНИЮ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА ВИТАМИНА РР

Навеску 0,05 г никотиновой кислоты, предварительно подсушенного в эксикаторе над концентрированной серной кислотой в течение 24 ч, переносят в колбу вместимостью 500 см³ добавляют 300 мл воды и 5 мл раствора серной кислоты с концентрацией 2,5 моль/л, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки, получая основной стандартный раствор с концентрацией витамина 20 мкг/мл. Раствор помещают в склянку из темного стекла и добавляют 5 мл толуола. Срок хранения основного стандартного раствора при 4 °С — 3 мес. Концентрация основного стандартного раствора витамина РР 100 мкг/мл.

2 мл полученного основного стандартного раствора витамина РР переносят в колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем раствора водой до метки, получая основной рабочий стандартный раствор с концентрацией витамина 2 мкг/мл. Раствор готовят в день проведения анализа.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БРОМНОЙ ВОДЫ

За 5 дней до испытания в темную склянку с хорошо притертой пробкой вносят под тягой 100 мл дистиллированной воды и 5 мл жидкого брома, встряхивают, смесь хранят под тягой в эксикаторе.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РОДАНБРОМИДНОГО РАСТВОРА

Роданбромидный раствор готовят в вытяжном шкафу в день испытаний. К 5–20 мл бромной воды, охлажденной до 0 °С, прибавляют в бане со льдом по капле раствор роданида калия до полного обесцвечивания брома. Затем постепенно прибавляют карбонат кальция до прекращения выделения пузырьков газа и образования осадка.

Раствор фильтруют в склянку из темного стекла с притертой пробкой и оставляют в ледяной бане до использования.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВОДНОЙ СУСПЕНЗИИ ГИДРОКСИДА КАЛЬЦИЯ

В стакане смешивают 25 г оксида кальция, добавляют 500 мл дистиллированной воды и перемешивают. Полученную суспензию хранят герметично закупоренной.

ПЕРЕКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ МЕТОЛА И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА

В стакане вместимостью 1000 мл нагревают до кипения 500 мл 0,05 М раствора серной кислоты, добавляют 100 г метола и продолжают нагревать смесь до начала кипения, добавляют 10 г активированного угля, перемешивают и сразу фильтруют через воронку для горячего фильтрования в стакан вместимостью 2 л.

К фильтрату добавляют 700 мл этилового спирта, перемешивают, стакан помещают в ледяную баню и оставляют в темноте на 5 ч или в холодильнике на ночь. Выпавшие кристаллы отсасывают на воронке Бюхнера, промывают спиртом с температурой 4 °С и высушивают на фильтровальной бумаге в темном месте в течение 3 дней в темноте. Перекристаллизованный продукт хранят в темной склянке герметично закупоренной при комнатной температуре.

Перед применением 8 г перекристаллизованного метола вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем до метки раствором 0,5 М HCl.

ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

ГИДРОЛИЗ

При анализе мяса, рыбы, яиц, готовых блюд применяют кислотный гидролиз 1 М раствором серной кислоты. Навеску измельченного продукта в количестве 10 г (предполагаемое содержание витамина составляет 1 мг/100 г продукта) помещают в колбу вместимостью 50 см³, приливают 40 мл 1 М раствора H₂SO₄. Массу навески выбирают такой, чтобы в растворе, поступающем на колориметрирование, концентрация витамина составляла 0,5–2,5 мкг/мл.

Гидролизуют смесь кипячением на водяной бане в течение 90 мин с обратным холодильником или автоклавированием при P = 0,1 МПа в течение 30 мин, смесь охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора до 50 мл и фильтруют через бумагу в мерный цилиндр вместимостью 100 мл.

25 мл фильтрата в мерном цилиндре нейтрализуют раствором 10 моль/л $\text{Ca}(\text{OH})_2$ по фенолфталеину до слабо-розового окрашивания. Объем нейтрализованного раствора доводят до 50 мл, перемешивают и фильтруют.

Для хлебобулочных и молочных изделий, овощей и фруктов проводят щелочной гидролиз. Навеску измельченного продукта в количестве 10 г (предполагаемое содержание витамина составляет 1 мг/100 г продукта) помещают в коническую колбу вместимостью 250 см³, приливают 10 мл водной суспензии гидроксида кальция и 40 мл воды. Массу навески выбирают такой, чтобы в растворе, поступающем на колориметрирование, концентрация витамина составляла 0,5–2,5 мкг/мл.

Гидролизуют смесь кипячением на водяной бане в течение 90 мин с обратным холодильником или автоклавированием при $P = 0,1$ МПа в течение 30 мин, смесь охлаждают до комнатной температуры, содержимое переносят в мерный цилиндр вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до 75 мл водой, перемешивают, выдерживают 2 ч при температуре ледяной бани или на ночь в холодильнике, фильтруют через бумагу и центрифугируют.

К 25 мл фильтрата в мерном цилиндре вместимостью 100 мл добавляют 2 капли раствора фенолфталеина и добавляют по каплям 2,5 М раствор серной кислоты до обесцвечивания.

Одновременно проводят обработку холостой пробы, взяв вместо 10 г навески образца 10 мл воды.

ОЧИСТКА ГИДРОЛИЗАТА

В цилиндр с нейтрализованным фильтратом добавляют 2 мл 800 г/л раствора ZnSO_4 , и по каплям 4 М раствор NaOH до получения слабо-розового окрашивания, смесь перемешивают, добавляют несколько капель 2,5 М раствора серной кислоты до обесцвечивания, выстаивают в течение 10 мин, добавляют 2 капли этилового спирта для разрушения пены и доводят объем водой до 50 мл, перемешивают и фильтруют через бумагу или центрифугируют. Срок хранения фильтрата 5 сут. при температуре 4 °С.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

В одну пробирку с притертой пробкой отмеривают 5 мл воды (контроль на реактивы).

В две пробирки вносят по 5 мл рабочего стандартного раствора витамина.

В четыре пробирки вносят по 5 мл очищенного раствора гидролизата испытуемого образца.

Все пробирки выдерживают в течение 5 мин при 50 °С, добавляют в две пробирки с гидролизатом 2 мл дистиллированной воды (контроль к испытуемому раствору), во все остальные — по 2 мл роданбромидного раствора, встряхивают содержимое, выдерживают при 50 °С в течение 10 мин, охлаждают проточной водой до комнатной температуры, выдерживают в темноте в течение 10 мин, добавляют по 3 мл раствора метола, перемешивают, выдерживают в течение 1 ч в темноте и фильтруют.

ИЗМЕРЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ

Оптическую плотность растворов измеряют против контроля при длине волны 400–425 нм.

РАСЧЕТ

Содержание витамина РР (X, мг/100 г продукта) вычисляют по формуле:

$$X = (A - A^1) \cdot C_{\text{ст}} \cdot V \cdot V_2 / (B - B^1) \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot g \cdot 10,$$

где: A — среднее показание оптической плотности для испытуемой пробы, условных единиц (делений) прибора; A¹ — среднее показание оптической плотности раствора контроля к испытуемому раствору, условных единиц (делений) прибора; B — среднее показание оптической плотности для испытуемой пробы для стандартного раствора витамина, условных единиц (делений) прибора; B¹ — среднее показание оптической плотности контроля раствора на реактивы, условных единиц (делений) прибора; C_{ст} — количество витамина РР во взятом объеме 5 мл рабочего стандартного раствора, мкг; V — общий объем испытуемого раствора гидролизата, мл; V₂ — объем испытуемого раствора гидролизата, взятого после очистки сульфатом цинка, мл; g — навеска образца, взятого для анализа, г; 10 — пересчет из мкг/г в мг/100 г пищевого продукта. V₁ — объем гидролизата, взятого на очистку, мл; V₃ — объем очищенного гидролизата, взятого для проведения цветной реакции, мл.

Результаты определений рассчитывают до второй значащей цифры и округляют до первого знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$. (При независимом определении 40%).

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания витамина любой пробы при допусках методом изменения влияющих факторов $\pm 0,1X$.

Минимальный уровень фотометрического обнаружения витамина РР составляет 2,5 мкг в колориметрируемом объеме, что соответствует 0,25 мкг/мл при степени извлечения витамина из пробы >75–90%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С ТИТРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Сущность метода заключается в изменении окраски индикатора 2,6-дихлорфенолиндофенола в зависимости от содержания витамина С (аскорбиновой кислоты).

Метод предназначен для анализа содержания витамина С в пищевых продуктах растительного, животного и другого происхождения.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с точностью взвешивания 0,0002 г. Термостат с регулируемым нагреванием 20–200 °С. Гомогенизатор типа микроразмельчителя тканей РТ-2. Секундомер. Термостат на 20–100 °С.

Микробюретка на 1–3 мл. Фарфоровая ступка. Конические и мерные колбы вместимостью 100 мл. Воронки. Пипетки автоматические на 1–15 мл. Стекланная палочка. Часовое стекло. Стакан химический вместимостью 100 мл.

РЕАКТИВЫ

2,6-дихлорфенолиндофенол натриевая соль чда, 0,001 н. раствор. Соляная кислота хч, 2% раствор. Соль Мора $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ чда, 0,01 н. раствор. Серная кислота хч, концентрированная, разведенная (1:2) водой и 10% раствор. Перманганат калия KMnO_4 хч, 0,01 н. Оксалат натрия хч, насыщенный (>3,5 г/100 г воды). Щавелевая кислота $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ хч, 0,01 н. раствор.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

20 г измельченной навески помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, заливают 20 мл 2%-ного раствора соляной кислоты, смесь встряхивают, доводят объем до метки 2% раствором HCl , выдерживают в течение 10 мин для более полного растворения витамина С. Содержимое колбы фильтруют через бумагу.

10 мл фильтрата отбирают в коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляют 15 дистиллированной воды, полученный раствор

титруют 0,001 н. раствором 2,6-дихлор-фенолиндофенола из микробюретки до появления устойчивого розового окрашивания, не исчезающего в течение 60 с.

Параллельно проводят титрование 15 мл 2% раствора HCl и 15 мл дистиллированной воды (контрольное титрование).

РАСЧЕТ

Содержание витамина С (X, мг/100 г продукта) вычисляют по формуле:

$$X = V_1 \cdot V_2 \cdot K \cdot 0,088 \cdot 100 / V_3 \cdot g,$$

где: V_1 — объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованного на титрование за вычетом поправки на контрольное титрование, мл; V_2 — сумма объемов испытуемой пробы и соляной кислоты, мл; g — навеска образца, взятого для анализа, г; V_3 — объем анализируемого раствора, взятого на титрование, мл; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты, точно соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлор-фенолиндофенола; K — поправка на титрование раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Поправочный коэффициент устанавливают по 0,01 н. раствору соли Мора. Титр соли Мора определяют по 0,01 н. KMnO_4 , а титр раствора перманганата по 0,01 н. раствору $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Для этого 1 мл концентрированной серной кислоты добавляют к 10 мл 0,01 н. раствора $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Смесь нагревают до 80 °С и титруют до слабо-розового окрашивания 0,01 н. раствором KMnO_4 (расход раствора V , мл). Затем титруют соль Мора, для этого к 10 мл раствора соли Мора добавляют 3 капли концентрированной серной кислоты и титруют 0,01 н. KMnO_4 (расход раствора V_1 , мл) до появления устойчивой слабо-розовой окраски. Далее титруют 0,001 н. раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола. Для этого к 10 мл добавляют 5 мл насыщенного раствора оксалата натрия и титруют из микробюретки раствором соли Мора до перехода окраски в соломенно-желтую (расход раствора V_2 , мл). Поправку K рассчитывают по формуле:

$$K = V_1 \cdot V_2 / V.$$

Результаты определений рассчитывают до второй значащей цифры и округляют до первого знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 15% по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$. (При независимом определении 35%).

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания витамина любой пробы при допускаемых методом изменениях влияющих факторов $\pm 0,075X$.

Минимальный уровень титрометрического обнаружения витамина С составляет 10 мкг в титруемом объеме, что соответствует 0,4 мкг/мл при степени извлечения витамина из пробы > 80–90%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С ЙОДОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Сущность метода заключается в изменении окраски йода при добавлении гипоиодита калия в зависимости от содержания витамина С (аскорбиновой кислоты).

Метод предназначен для анализа содержания витамина С в пищевых продуктах растительного, животного и другого происхождения в сильно окрашенных растворах.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с точностью взвешивания 0,0002 г. Термостат с регулируемым нагреванием 20–200 °С. Гомогенизатор типа микроразмельчителя тканей РТ-2.

Микробюретка на 1–3 мл. Фарфоровая ступка. Конические и мерные колбы вместимостью 100 мл. Воронки. Пипетки автоматические на 1–15 мл.

РЕАКТИВЫ

Гипоиодит калия, 0,001 н. раствор. Соляная кислота хч, 1% раствор. H_3PO_4 чда, 2% раствор. Калия йодид хч. 1% раствор крахмала.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

10 г измельченной навески помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, заливают 20 мл 1%-ного раствора соляной кислоты, смесь встряхивают, доводят объем до метки 2% раствором метафосфорной кислоты, выдерживают в течение 10 мин для более полного растворения витамина С. Содержимое колбы фильтруют через бумагу.

По 10 мл фильтрата отбирают в 3 конические колбы вместимостью 100 мл. В две колбы добавляют по кристаллику KI и 3 капли 1% раствора крахмала, полученные растворы титруют 0,001 н. раствором гипоиодита калия из микробюретки. Даже в интенсивно-розовых растворах

заметна фиолетовая окраска, появляющаяся от добавления 1 капли титранта. Для сравнения окраски третья колба должна стоять рядом.

Параллельно проводят титрование 10 мл 2% раствора H_3PO_4 (контрольное титрование).

РАСЧЕТ

Содержание витамина С (X, мг/100 г продукта) вычисляют по формуле:

$$X = V_1 \cdot V_2 \cdot K \cdot 0,088 \cdot 100 / V_3 \cdot g,$$

где: V_1 — объем раствора 0,001 н. раствора гипоиодита калия, израсходованного на титрование за вычетом поправки на контрольное титрование, мл; V_2 — объем испытуемой пробы, мл; g — навеска образца, взятого для анализа, г; V_3 — объем анализируемого раствора, взятого на титрование, мл; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты, точно соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора гипоиодита калия; K — поправка на титрование раствора.

Поправочный коэффициент устанавливают по 0,01 н. раствору соли Мора. Титр соли Мора определяют по 0,01 н. KMnO_4 , а титр раствора перманганата по 0,01 н. раствору $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Для этого 1 мл концентрированной серной кислоты добавляют к 10 мл 0,01 н. раствора $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Смесь нагревают до 80 °С и титруют до слабо-розового окрашивания 0,01 н. раствором KMnO_4 (расход раствора V, мл). Затем титруют соль Мора, для этого к 10 мл раствора соли Мора добавляют 3 капли концентрированной серной кислоты и титруют 0,01 н. KMnO_4 (расход раствора V_1 , мл) до появления устойчивой слабо-розовой окраски. Далее титруют 0,001 н. раствором гипоиодита калия. Для этого к 10 мл добавляют 5 мл насыщенного раствора оксалата натрия и титруют из микробюретки раствором соли Мора до перехода окраски в соломенно-желтую (расход раствора V_2 , мл). Поправку K рассчитывают по формуле

$$K = V_1 \cdot V_2 / V.$$

Результаты определений рассчитывают до второй значащей цифры и округляют до первого знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 25% по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$. (При независимом определении 60%).

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания витамина любой пробы при допустимых методах изменения влияющих факторов $\pm 0,125X$. Минимальный уровень титрометрического обнаружения витамина С составляет 10 мкг в титруемом объеме, что соответствует 0,4 мкг/мл при степени извлечения витамина из пробы >80–90%.

9.2 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГОРМОНОВ

Гормоны являются неотъемлемой составляющей всех живых систем. Интенсификация сельскохозяйственного производства и все более широкое применение различных стимулирующих веществ для быстрого выращивания скота и птицы приводят к развитию недостаточно контролируемого процесса использования гормональных стимуляторов. Остатки стимуляторов в пищевой продукции несут угрозу здоровью человека.

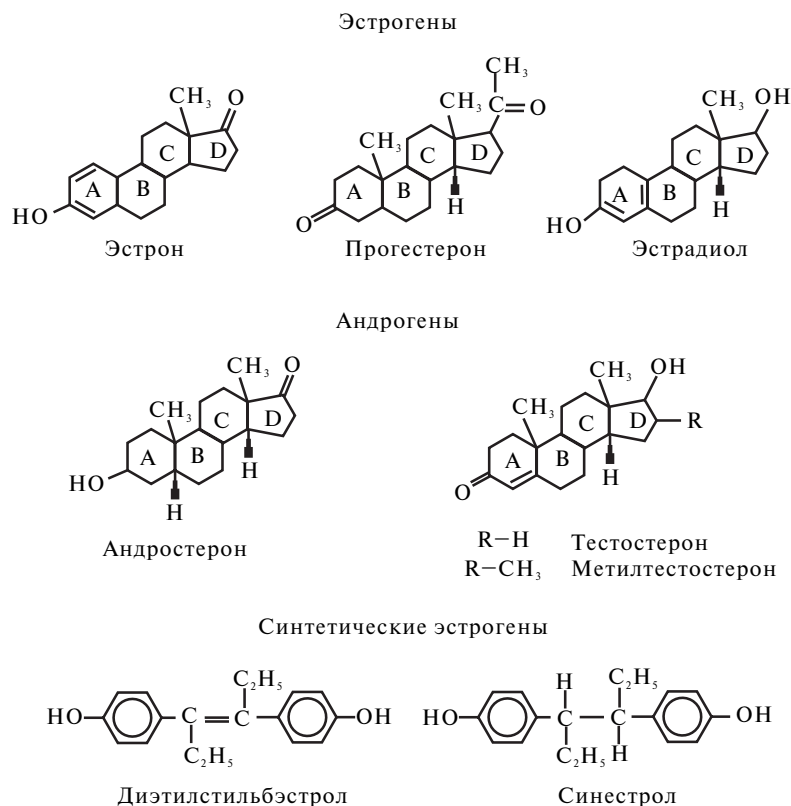


Таблица 9.4

Нормируемые в странах ЕС уровни содержания гормональных препаратов

Наименование	Объект контроля	Допустимый уровень, мкг/кг	Метод контроля*
Тестостерон	Сыворотка крови	0,5	ГХ–МС, РИА, ВЭЖХ, ИФА
Эстрадиол 17β	Сыворотка крови	0,04	ГХ–МС, РИА, ВЭЖХ, ИФА
Метилтестостерон	Сыворотка крови, мясо	2,0 0	РИА, ИФА
Этинилэстрадиол	мясо	0	ГХ–МС, ВЭЖХ, ИФА
Тренболон	мясо	0	ГХ–МС, РИА, ВЭЖХ, ИФА
Диэтилстильбэстрол	мясо, печень	0	ГХ–МС, РИА, ВЭЖХ, ИФА
Зеранол	мясо	0	ГХ–МС, ВЭЖХ, ИФА
Кленбутерол	сыворотка крови, мясо, печень,	0 0	ГХ–МС, ВЭЖХ, ИФА
Дексаметазон	Мясо, печень, сыворотка крови	0,5 2,0	ГХ–МС, ВЭЖХ, ИФА
19-нортестостерон	Мясо	1,0	РИА, ИФА
Гестагены	Жир	0	РИА, ВЭЖХ, ИФА
Тиреостатики	Сыворотка крови	<100	ГХ–МС, ТСХ, ВЭЖХ

*) ГХ–МС — газовая хроматография с масс-детектированием, РИА — радиоиммунологический анализ, ВЭЖХ (HPLC) — высокоэффективная жидкостная хроматография, ИФА (ELISA) — иммуноферментный анализ, ТСХ — тонкослойная хроматография

Таблица 9.5

Нормируемые в Российской Федерации уровни содержания стимуляторов

Наименование	Объект контроля	Допустимый уровень, мкг/кг
Эстрадиол 17β	–	–
Тестостерон	–	По международным нормам
Прогестерон	–	–
Тренболон	Мясо, печень	2 10
Зеранол	Рогатый скот, мясо, печень	2 10
Карбадокс	свиньи мясо, печень	5 10
Соматотропин	Мясо, печень	–
Дексаметазон	Рогатый скот, мясо, печень	0,5 2,5
Азаперон	свиньи мясо, почки	60 100

Экономическая привлекательность применения стимуляторов в животноводстве и птицеводстве диктует необходимость жесткого аналитического контроля за безопасностью мясной продукции, в том числе на содержание остаточных гормонов.

На основании действующих директив Европейского сообщества ЕС 469/86, ЕС 675/92, ЕС 1430/94, ЕС 3426/93, ЕС 23/96 и ЕС 22/96 установлен и осуществляется систематический контроль за остаточным содержанием гормональных препаратов в мясе и мясных продуктах (мясо скота и птицы) по следующим веществам (см. табл. 9.4).

В соответствии с требованиями нормативной документации в Российской Федерации СанПиН 2.3.2.560–96, приложение 2 установлен контроль за содержанием следующих стимуляторов (см. табл. 9.5).

Наличие достаточно обширной группы биологически активных веществ разной химической природы, остаточный уровень содержания которых в мясной продукции находится на уровне нескольких долей мкг в одном кг массы образца предопределяет использование высокочувствительных методов физико-химического анализа, требующих, как правило, весьма дорогостоящего оборудования [73].

Минимальный предел обнаружения наиболее распространенных гормонов может быть оценен на следующем уровне (табл. 9.6).

Таблица 9.6

Минимальные пределы содержания гормональных препаратов, достоверно определяемые различными методами

Метод анализа	Минимальный уровень обнаружения, мкг/кг	Наименование гормона	ПДК, мкг/кг
ГХ	0,25	Эстрадиол 17β	0,5
ИФА	0,25	Эстрадиол 17β	0,5
	1,5	Диэтилстильбэстрола	0
РИА	4	Эстрадиол 17	0,5
ТСХ	10	Диэтилстильбэстрола	0
ВЭЖХ	5	Эстрадиол 17β	0,5

Из существующих методов контроля метод ELISA по простоте и достоверности результатов может удовлетворять всем требованиям, предъявляемым к методам рутинного экспресс контроля, и позволяет определять содержание вредных примесей на уровне до 0,1 нг/мл.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТИЛЬБЕНОВ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМ ELISA

Метод основан на высокоспецифическом связывании экстрагированного из образца стильбена антителами. Анализируемый образец подвергают экстракции обработкой органическим растворителем с последующим перерастворением экстрагированного из образца вещества в фосфатном буфере и его очисткой на иммуно-аффинной колонке.

Иммуно-аффинные колонки на стильбены используются для очистки и избирательного выделения гексоэстрола, диэтилстильбэстрола и диеноэстрола из образцов мясной ткани и продуктов переработки. Данные колонки содержат антитела к гексоэстролу, диэтилстильбэстролу и диеноэстролу, иммобилизованные на твердый носитель. Использование колонок улучшает извлекаемость стильбенов и значительно ускоряет пробоподготовку, в сравнении с другими методами.

После колонки получают раствор, который содержит очищенный гормон и его подвергают иммуноферментному или хроматографическому анализу методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для определения иммуноферментным методом используется активированная плашка сенсibilизированная антителами, специфичными к гексоэстролу, диэтилстильбэстролу и диеноэстролу.

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для определения стильбенов иммуноферментным методом используют набор для иммуноферментной очистки экстрактов, включающий: иммуно-аффинную колонку (кат. N SJ 2154, «Randox Lab. Ltd.», Англия) на 10 определений с максимальной поглощающей емкостью по диэтилстильбэстролу 50 нг/колонку, концентрированный буферный раствор для промывки колонки, концентрированный раствор для хранения колонки, а также вспомогательный набор для определения стильбенов иммуноферментным методом (кат. N SJ 2152) на 96 определений, включающий: микро-плашку на 12 × 8 разборных ячеек с сенсibilизированными к стильбенам антителами, буферный раствор для промывки плашки и разбавления проб, белковый конъюгат, субстрат для окрашивания пробы, хромоген для окрашивания пробы, набор стандартных растворов с концентрацией стильбена (гексаэстрола) нг/мл: 0; 0,05; 0,29; 0,53; 1,1 и 5,1.

Центрифуга на >2000 G. Устройство для испарения растворов, включающее трубку, через которую на поверхность жидкой смеси при температуре 70–80 °С под непрерывным потоком подают сжатый воздух или азот из баллона. Пробирки. Микропипетки на 25, 50, 100, 125 и 1000 мкл. Микроизмельчитель ткани. Вода бидистиллированная. Метилтретбутиловый или серный эфир хч. Натрия гидроксид 1 М раствор хч. Хлороформ, хч. Фосфорная кислота 6 М раствор. Соляная кислота 1 М раствор. Спирт этиловый, водный раствор 70%. Пленка парафилм.

Фотометр для определения оптической плотности среды в ячейках плашек Strip Reader EL-301 производства Bio-Tek Instruments (США) с длиной волны 450 нм.

ПОДГОТОВКА И РАЗБАВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ РЕАГЕНТОВ

Буферный раствор для промывки колонки готовят смешением одного объема концентрированного раствора моющего буфера с 19-ю объемами воды дистиллированной. Раствор для длительного хранения колонки готовят смешиванием одного объема концентрированного раствора буфера хранения с 4-мя объемами бидистиллята.

Активированная плашка и иммуноферментная колонка в наборе готовы для использования и стабильны в течение 2 лет при условии хранения при температуре +2...+8 °С. При частичном использовании плашки оставшуюся часть вакуумировали вместе с осушителем и сохраняли при той же температуре в холодильнике.

Для плашек используют буферный раствор, концентрированный, который разбавляют, смешивая содержимое емкости с концентрированным буферным раствором (в количестве 32 мл) с 970 мл бидистиллированной воды, раствор стабилен в течение 30-ти сут. при условии хранения при температуре +2...+8 °С. Белковый конъюгат готовят из концентрированного конъюгата со сроком хранения 1 год, используя прилагаемую к набору инструкцию по разбавлению в 1500 раз. Разбавленный раствор конъюгата используют немедленно после приготовления. Субстраты для окрашивания пробы (субстрат А и В) перед применением смешивают в соотношении 1:1.

ПОДГОТОВКА АФФИННОЙ КОЛОНКИ

Колонку из набора с 1 мл слоя аффинного сорбента кондиционируют, промывая 15 мл разбавленного раствора моющего буфера (расход меньше чем 3 мл/мин). По окончании работы колонку промывают

пропуская 10 мл 70%-ного раствора этилового спирта в воде, заливают буфером хранения и помещают в холодильник.

ВЫДЕЛЕНИЕ СТИЛЬБЕНОВ ИЗ ОБРАЗЦА

Подготовку пробы анализируемого образца осуществляют следующим образом. 2,5 г образца гомогенизируют с 15 мл метил-третбутилового или серного эфира, перемешивают гомогенат и отделяют с помощью центрифугирования в течение 10 мин при скорости вращения ротора 2000 об/мин или отстаиванием 12 мл эфирного слоя, который испаряют в токе сжатого воздуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл хлороформа, добавляют 2 мл 1 М раствора NaOH, перемешивают раствор и отделяют 1 мл водного слоя с последующим добавлением еще 1 мл 1 М раствора NaOH к слою хлороформа и отделением 1 мл водного экстракта, который нейтрализуют, добавляя к 2 мл экстракта 200 мкл 6 М раствора фосфорной кислоты. Весь объем нейтрализованного раствора наносят на иммуноаффинную колонку после ее кондиционирования.

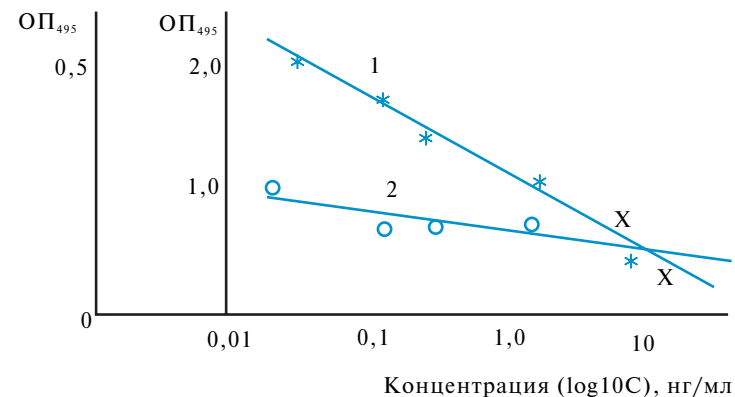


Рис. 9.7. Зависимость оптической плотности среды при 450 (1) и 495 нм (2) комплекса диэтилстильбэстрола с конъюгатом Randox от концентрации стильбена в 70%-ном этаноле (для стандартов 0,05; 0,24; 0,56; 0,95 и 4,6 нг/мл по гексаэстролу). X — определяемая концентрация неизвестного образца после иммуноферментной колонки в количестве 30 нг в 3 мл 70%-ного этанола

Экстракт пропускают через колонку самотеком, промывают колонку 5 мл разбавленного раствора моющего буфера и 5 мл бидистиллированной воды (расход меньше чем 2 мл/мин). Элюируют фракцию стильбенов, промывая колонку 3 мл 70%-ного раствора этилового спирта в воде. Колонку окончательно отмывают 10 мл 70%-ного раствора этилового спирта в воде и заливают буфером хранения.

С помощью пипетки в соответствующие лунки плашки вносят по 100 мкл разбавленного буферного раствора и 25 мкл анализируемого и полученного с иммуноферментной колонки раствора или раствора стандартного образца, выдерживают плашку в темноте при комнатной температуре (+19...+25 °С) в течение одного часа, с помощью пипетки добавляют по 75 мкл разбавленного раствора конъюгата в каждую лунку плашки, выдерживают в течение 30-ти минут, промывают плашку 10 раз разбавленным буферным раствором и подсушивают на фильтровальной бумаге в перевернутом виде. Затем добавляют в каждую лунку по 125 мкл смеси 1:1 субстратов А и В, выдерживают плашку в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут, добавляют в каждую лунку по 50 мкл 1 М раствора соляной кислоты, наблюдая изменение голубого окрашивания раствора в лунках плашки на желтое и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм.

Вычисляют средние величины оптической плотности, измеренной в каждой лунке, и строят график зависимости оптической плотности от концентрации стандартных растворов в полулогарифмических координатах, то есть калибровочную кривую. Градуировочный график определения представлен на рис. 9.7.

При исследовании образцов мясной ткани, с целью пересчета результата определения в единицы нг/г, результат, полученный с помощью калибровочной кривой, умножают на коэффициент 2,8.

Положительные результаты анализа определения должны быть подтверждены арбитражным хроматографическим методом.

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

При искусственном загрязнении проб диэтилстильбэстролом степень извлечения анализируемого веществ составляет $85 \pm 10\%$.

Нижний предел обнаружения в растворе приведен в табл. 9.8.

Таблица 9.8

Минимальный уровень обнаружения гормона иммуноферментным методом

Вещество	Образцы ткани мяса
Гексоэстрол	0,25 нг/мл
Диэтилстильбэстрол	0,60 нг/мл
Диеноэстрол	1,25 нг/мл

НИЖНИЙ ПРЕДЕЛ В ПРОБЕ по диэтилстильбэстролу — 1,7 мкг/кг.
СПЕЦИФИЧНОСТЬ определения дана в табл. 9.9.

Таблица 9.9

Перекрестная чувствительность обнаружения стильбенов иммуноферментным методом

Соединение	Перекрестная чувствительность, %
Гексоэстрол	100
Диэтилстильбэстрол-глюкоронид	85
Диэтилстильбэстрол	43
Диеноэстрол	20

ТОЧНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТИЛЬБЕНОВ МЕТОДОМ ELISA приведена в табл. 9.10.

Таблица 9.10

Точность определения диэтилстильбэстрола иммуноферментным методом

Концентрация, нг/мл	Выборка опытов	Достоверность \pm
0	9	3,5
0,05	9	3,6
0,24	9	5,5
0,56	9	7,6
0,95	8	6,6
4,6	9	6,4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДИЭТИЛСТИЛЬБЭСТРОЛА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Диэтилстильбэстрол образует продукты взаимодействия с фторпроизводными некоторых органических соединений, а также дает фотохимическую реакцию при облучении в УФ-свете, что используется для хроматографического анализа вещества.

Метод тонкослойной хроматографии с использованием денситометра является достаточно чувствительным, что позволяет проводить количественное определение остатков диэтилстильбэстрола в образцах животного происхождения.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АБУ-6с. Лампа ртутно-кварцевая типа ПРК-4. Колбы перегонные К-1-250-29/32. Колбы Гр-25-14/23. Колбы мерные

2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В-56–80 ХС. Колба коническая Кн-1–250–29/32. Цилиндры мерные 1–50, 1–100. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стеклянные банки с притертыми крышками, вместимостью 500, 1000 см³. Воронки делительные ВД-100–29/32, ВД-250–29/32. Стакан В-1–50. Центрифуга (>5000 G). Термостат на 20, 37, 60, 200 °С. Гомогенизатор животной ткани. Пипетки 1–2–2–5, 1–2–2–10. Вата медицинская гигроскопическая. Бумага фильтровальная лабораторная. Колонка стеклянная хроматографическая 0,7 × 7 см и вместимостью 100 мл.

Лампа ртутно-кварцевая ультрафиолетовая типа ПРК-4. Микропипетки автоматические на 5, 20, 500 и 1000 мкл. Пластинки хроматографические «Силуфол» производства Чехии, или «Сорбфил» (Россия), или «Merck» (ФРГ). Камера для хроматографирования: сосуд с плоским дном, закрывающийся пришлифованной крышкой, стеклянный. Денситометр для количественного определения пятен на хроматограмме.

РЕАКТИВЫ

Хлороформ, хч, перегнанный. Эфир диэтиловый медицинский. Изооктан, хч. Спирт этиловый ректификованный, хч. Метанол. Бензол, хч для хроматографии. Кислота соляная концентрированная, 2 М раствор, хч. Гидроксид натрия, хч. Натрий сульфат безводный, хч. β-глюкуронидаза, 0,1 М ацетатный буфер рН 4,8. Силикагель Л 40/100 для хроматографии. Вода дистиллированная. Бумага хроматографическая. Бумага индикаторная универсальная для определения рН. Эталон диэтилстильбэстрола гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

ОЧИСТКА СИЛИКАГЕЛЯ

В стакан насыпают силикагель, промывают водой, воду сливают с мелкими фракциями. Промытый силикагель в количестве 5 г тонким слоем прокалывают при температуре 200 °С в течение 3 ч. Затем к силикагелю добавляют 5% об. воды и встряхивают в течение 0,5 ч. К силикагелю добавляют 20 мл хлороформа, перемешивают и суспензию переносят на колонку и формируют слой 0,7 × 7 см. Колонку применяют непосредственно после подготовки силикагеля. Для подтверждения работоспособности колонки проводят контрольные исследования условий элюции с использованием стандартного раствора диэтилстильбэстрола.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГРУДУИРОВОЧНЫХ РАСТВОРОВ ДИЭТИЛСТИЛЬБЭСТРОЛА

Основные градуировочные растворы с массовой концентрацией (4–160) мкг/см³ готовят весовым способом путем растворения соответствующей навески диэтилстильбэстрола в 96%-ном этаноле, получая растворы с содержанием вещества 4 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл, 80 мкг/мл, 160 мкг/мл. Все растворы стабильны при хранении в колбах с притертыми пробками в холодильнике в течение 6 мес.

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КАМЕРЫ

В хроматографическую камеру за 1 ч до начала хроматографирования заливают смесь растворителей для насыщения ее парами. Объем растворителя в камере должен находиться на высоте не более чем 0,5 см от уровня дна.

ПОДГОТОВКА ПЛАСТИН ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИИ

Хранившиеся пластины для ТСХ перед употреблением промывают. Для этого в хроматографическую камеру наливают систему растворителей ацетон-аммиак (1:1) на высоту 5–7 мм и помещают туда пластины в вертикальном положении.

После того, как линия фронта растворителя поднимется, не доходя 10 мм до верха пластинки, ее вынимают, высушивают на воздухе, затем активируют в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 30–60 мин. Перед употреблением с вертикальных сторон пластинки удаляют слой в 3 мм, что способствует выравниванию фронта растворителя.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ЭКСТРАКЦИЯ

Из объединенной пробы мяса и субпродуктов отбирают навеску массой 20 г, помещают в гомогенизатор, смешивают с 60 мл этанола и гомогенизируют в течение времени достаточном для получения однородной суспензии, экстракт отделяют от остатков волокна фильтрованием через бумажный фильтр, волокна ткани смешивают с 10 г целита, смесь переносят на колонку и дополнительно экстрагируют диэтилстильбэстрол пропуская 150 мл этанола. Экстракты объединяют.

ГИДРОЛИЗ

К объединенному экстракту добавляют 10 мл 2 М раствора HCl и упаривают на роторном испарителе при температуре 55 °С в течение 1 ч до остаточного объема в 20 мл. Выпадающий осадок отделяют фильтрованием через бумажный фильтр. Отфильтрованный гидролизат переносят в колбу, добавляют 40 мл дистиллированной воды, 60 мл хлороформа и встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 0,5 ч.

После разделения фаз в делительной воронке проводят повторную экстракцию водного слоя добавлением 60 мл хлороформа.

ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ В СИСТЕМЕ ХЛОРОФОРМ-NaOH

Объединенный хлороформный экстракт смешивают в делительной воронке с 50 мл 1 М раствора NaOH, встряхивают, хлороформ отбрасывают, экстракцию повторяют с новой порцией 50 мл 1 М раствора NaOH, фазы с NaOH объединяют, подкисляют соляной кислотой до pH 4,0, дважды экстрагируют равным объемом хлороформа и выпаривают досуха на роторном испарителе. Коэффициенты распределения (растворитель/ водная фаза) диэтилстильбэстрола в системе хлороформ/вода — 0,016, хлороформ/1 М NaOH — 16,6, эфир/вода — 0,01, эфир/1 М NaOH — 20,0. При образовании эмульсии смесь подвергают разделению центрифугированием при 5000 G в течение 20 мин.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ЖИРА

10 г жировой ткани измельчают и расплавляют прогреванием в изооктане в соотношении 1:5. Процесс экстракции повторяют трижды. Экстракты объединяют, фильтруют через бумажный фильтр, смешивают с 40 мл 1 М раствора NaOH, отделяют водный щелочной слой, подкисляют его до значения pH 4, дважды экстрагируют равным объемом хлороформа и выпаривают досуха на роторном испарителе.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ МОЛОКА И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

К 5 мл молока добавляют 15 мл 0,1 М ацетатного буфера pH 4,8 и β-глю-куронидазу из расчета концентрации фермента в реакционной смеси 1000 ед/мл. Гидролиз смеси проводят при 37 °С в течение 24 ч. Гидролизат экстрагируют эфиром 3 × 20 мл. Эфирные экстракты

встряхивают в делительной воронке с 1 М раствором NaOH (2×40 мл), отделяют водный щелочной слой, подкисляют его до значения pH 4, дважды экстрагируют равным объемом хлороформа осушают над слоем безводного сульфата натрия и выпаривают досуха на роторном испарителе.

ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА СИЛИКАГЕЛЕ

Исследуемую пробу растворяют в 1 мл хлороформа и наносят на колонку 0,7 × 7 см с подготовленным силикагелем Л 40/100. Колонку промывают пропусканием 20 мл хлороформа, (фракция 1, не содержащая диэтилстильбэстрол), 10 мл 1% этанола в хлороформе (фракция 2, не содержащая диэтилстильбэстрол), 30 мл 1,5% этанола в хлороформе (фракция 3, содержащая диэтилстильбэстрол).

Фракцию 3, содержащую диэтилстильбэстрол, упаривают на роторном испарителе досуха.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Сухой остаток от полученной фракции 3 растворяют в минимальном количестве метанола (30–50 мкл) и наносят на подготовленную хроматографическую пластинку. Рядом на пластинку наносят 4, 10, 20, 80 нг стандарта диэтилстильбэстрола из соответствующих количеств растворов стандартов и подвергают восходящей хроматографии в системе: эфир-бензол (1:5) до тех пор, пока фронт растворителя не достигнет верхнего края пластинки.

Пластинку высушивают на воздухе, слегка подогревая, и облучают в ультрафиолете в течение 0,5 ч. Происходит превращение диэтилстильбэстрола в желто-окрашенный трициклический дикетон и на пластинке проявляются желтые пятна продуктов фотохимической реакции.

Количественную оценку проводят визуально, сопоставляя размер и светимость пятен стандартов и пятна образованного при нанесении исследуемой пробы. Площади пятен измеряют с помощью линейки или шаблона из миллиметровой бумаги или с использованием сканирующего денситометра.

РАСЧЕТ

Содержание диэтилстильбэстрола X, мг/кг, вычисляют по формуле:

$$X = m \cdot S_1 \cdot V_1 / m_1 \cdot S_2 \cdot V_2,$$

где: m — масса диэтилстильбэстрола в 1 см³ стандартного раствора, мкг; m_1 — масса навески исследуемого продукта, из которой извлечено данное количество диэтилстильбэстрола, г; S_1 — площадь пятна, полученного при нанесении испытуемого экстракта, мм²; S_2 — площадь пятна, полученного при нанесении стандартного раствора, мм²; V_1 — объем экстракта, в котором перерастворен сухой остаток, см³; V_2 — объем исследуемого экстракта, нанесенного на пластинку, см³.

При нанесении всей пробы $V_1 = V_2$.

Вычисления производят до первого десятичного знака. Окончательный результат округляют до целого числа.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 30% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания гормона любой пробы при допускаемых методом изменениях влияющих факторов $\pm 0,15X$.

Минимально обнаруживаемое содержание вещества в хроматографируемой пробе 0,2 мкг в индивидуальном пятне. Минимальная чувствительность метода 0,004 мг/кг ткани.

Значение среднего квадратичного отклонения случайной составляющей погрешности измерений содержания диэтилстильбэстрола в одной и той же пробе при допускаемых методом изменениях влияющих факторов составляет $\pm 0,2X$.

Степень извлечения вещества из животной ткани составляет 65–85%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДИЭТИЛСТИЛЬБЭСТРОЛА ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) основан на экстракции диэтилстильбэстрола полярным органическим растворителем, кислотном гидролизе конъюгатов спиртовым раствором, очистке экстракта переэкстракцией в растворителях и адсорбцией в тонком слое с последующим количественным измерением на газовом хроматографе с детектором захвата электронов.

Газохроматографической метод используют как самостоятельный метод анализа, а также для подтверждения результатов, полученных тонкослойной хроматографией.

ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АБУ-6с. Лампа ртутно-кварцевая типа ПРК-4. Колбы перегонные К-1–250–29/32. Колбы Гр-25–14/23. Колбы мерные 2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В-56–80 ХС. Колба коническая Кн-1–250–29/32. Цилиндры мерные 1–50, 1–100. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Стеклянные банки с притертыми крышками, вместимостью 500, 1000 см³. Воронки делительные ВД-100–29/32, ВД-250–29/32. Стакан В-1–50. Центрифуга (>5000 G). Термостат на 20, 37, 60, 200 °С. Гомогенизатор животной ткани. Пипетки 1–2–2–5, 1–2–2–10. Вата медицинская гигроскопическая. Бумага фильтровальная лабораторная. Колонка стеклянная хроматографическая 0,7 × 7 см и вместимостью 100 мл.

Микропипетки автоматические на 5, 20, 500 и 1000 мкл. Камера для хроматографирования: сосуд с плоским дном, закрывающийся пришлифованной крышкой, стеклянный.

Газовый хроматограф Газохром 1109 или аналогичный, например, типа Varian, с детектором захвата электронов.

Микрошприц МШ 10 или аналогичный для ввода 0,1–10 мкл пробы заколом через мембрану инжектора хроматографа.

Баллон стальной для сжатого газа, номинальное давление 150 ат.

Азот газообразный, марки «особой чистоты» или азот с содержанием кислорода не более 0,004% или гелий.

Колонки хроматографические для газового хроматографа длиной 3,0 м диаметром 3 мм.

Насадки для колонки (наполнение набивных колонок): 5% SE-60 на хроматоне N-AW-ГМДС (0,16–0,20 мм) или капиллярная колонка в соответствии с документацией к газовому хроматографу.

РЕАКТИВЫ

Хлороформ, хч, перегнанный. Эфир диэтиловый медицинский. Изооктан, хч. Спирт этиловый ректифицированный, хч. Метанол. Бензол, хч для хроматографии. Кислота соляная концентрированная, 2 М раствор, хч. Гидроксид натрия, хч. Натрий сульфат безводный, хч. β-глюкуронидаза. 0,1 М ацетатный буфер рН 4,8. Изооктан. Силикагель Л 40/100 для хроматографии. Вода дистиллированная. Бумага хроматографическая. Бумага индикаторная универсальная для опре-

деления рН. Ангидрид гептафтормасляной или трифторуксусный. Эталон диэтилстильбэстрола гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%.

Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ ОЧИСТКА СИЛИКАГЕЛЯ

В стакан насыпают силикагель, промывают водой, воду сливают с мелкими фракциями. Промытый силикагель в количестве 5 г тонким слоем прокаливают при температуре 200 °С в течение 3 ч. Затем к силикагелю добавляют 5% об. воды и встряхивают в течение 0,5 ч. К силикагелю добавляют 20 мл хлороформа, перемешивают и суспензию переносят на колонку и формируют слой 0,7 × 7 см. Колонку применяют непосредственно после подготовки силикагеля. Для подтверждения работоспособности колонки проводят контрольные исследования условий элюции с использованием стандартного раствора диэтилстильбэстрола.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГРАДУИРОВАННЫХ РАСТВОРОВ ДИЭТИЛСТИЛЬБЭСТРОЛА

Основные градуировочные растворы с массовой концентрацией (4–160) мкг/см³ готовят весовым способом путем растворения соответствующей навески диэтилстильбэстрола в 96%-ном этаноле, получая растворы с содержанием вещества 4 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл, 80 мкг/мл, 160 мкг/мл. Все растворы стабильны при хранении в колбах с притертыми пробками в холодильнике в течение 6 мес.

ПОДГОТОВКА ГАЗОВОГО ХРОМАТОГРАФА ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ

Сухую стеклянную колонку, предварительно промытую хромовой смесью, этиловым спиртом, затем диэтиловым эфиром, заполняют носителем с помощью вакуумного или водоструйного насоса. При этом набивку колонки периодически уплотняют, постукивая по колонке деревянной палочкой. Установленную в термостате хроматографическую колонку перед работой кондиционируют в следующем режиме: 2 ч при 100 °С; 2 ч при 150 °С; 4 ч при 200 °С; 4 ч при 220 °С. При

кондиционировании колонка должна быть отключена от детектора. Кондиционирование следует проводить при смене колонки, а также после длительных перерывов в работе. При использовании капиллярной колонки проводят ее подготовку в соответствии с технической документацией к прибору.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ЭКСТРАКЦИЯ

Из объединенной пробы мяса и субпродуктов отбирают навеску массой 20,0 г, помещают в гомогенизатор, смешивают с 60 мл этанола и гомогенизируют в течение времени достаточном для получения однородной суспензии, экстракт отделяют от остатков волокна фильтрованием через бумажный фильтр, волокна ткани смешивают с 10 г целита, смесь переносят на колонку и дополнительно экстрагируют диэтилстильбэстрол пропусканием 150 мл этанола. Экстракты объединяют.

ГИДРОЛИЗ

К объединенному экстракту добавляют 10 мл 2 М раствора HCl и упаривают на ротормном испарителе при температуре 55 °С в течение 1 ч до остаточного объема в 20 мл. Выпадающий осадок отделяют фильтрованием через бумажный фильтр. Отфильтрованный гидролизат переносят в колбу, добавляют 40 мл дистиллированной воды, 60 мл хлороформа и встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 0,5 ч.

После разделения фаз в делительной воронке проводят повторную экстракцию водного слоя добавлением 60 мл хлороформа.

ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ В СИСТЕМЕ ХЛОРОФОРМ-NaOH

Объединенный хлороформный экстракт смешивают в делительной воронке с 50 мл 1 М раствора NaOH, встряхивают, хлороформ отбрасывают, экстракцию повторяют с новой порцией 50 мл 1 М раствора NaOH, фазы с NaOH объединяют, подкисляют соляной кислотой до рН 4,0, дважды экстрагируют равным объемом хлороформа и выпаривают досуха на ротормном испарителе. Коэффициенты распределения (растворитель/ водная фаза) диэтилстильбэстрола в системе хлороформ/ вода — 0,016, хлороформ / 1 М NaOH — 16,6, эфир/вода — 0,01, эфир / 1М NaOH — 20,0. При образовании эмульсии смесь подвергают разделению центрифугированием при 5000 G в течение 20 мин.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ЖИРА

10 г жировой ткани измельчают и расплавляют прогреванием в изооктане в соотношении 1:5. Процесс экстракции повторяют трижды. Экстракты объединяют, фильтруют через бумажный фильтр, смешивают с 40 мл 1 М раствора NaOH, отделяют водный щелочной слой, подкисляют его до значения pH 4, дважды экстрагируют равным объемом хлороформа и выпаривают досуха на роторном испарителе.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ МОЛОКА И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

К 5 мл молока добавляют 15 мл 0,1 М ацетатного буфера pH 4,8 и β-глюкуронида-зу из расчета концентрации фермента в реакционной смеси 1000 ед/мл. Гидролиз смеси проводят при 37 °С в течение 24 ч. Гидролизат экстрагируют эфиром 3 × 20 мл. Эфирные экстракты встряхивают в делительной воронке с 1 М раствором NaOH (2 × 40 мл), отделяют водный щелочной слой, подкисляют его до значения pH 4, дважды экстрагируют равным объемом хлороформа осушают над слоем безводного сульфата натрия и выпаривают досуха на роторном испарителе.

ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА СИЛИКАГЕЛЕ

Исследуемую пробу растворяют в 1 мл хлороформа и наносят на колонку 0,7 × 7 см с подготовленным силикагелем Л 40/100. Колонку промывают пропуском 20 мл хлороформа, (фракция 1, не содержащая диэтилстильбэстрол), 10 мл 1% этанола в хлороформе (фракция 2, не содержащая диэтилстильбэстрол), 30 мл 1,5% этанола в хлороформе (фракция 3, содержащая диэтилстильбэстрол). Фракцию 3, содержащую диэтилстильбэстрол, упаривают на роторном испарителе досуха.

ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Сухой остаток растворяют в 500 мкл этанола и наносят на полоску хроматографической бумаги и рядом на бумагу наносят 5–10 мкг стандарта диэтилстильбэстрола в виде соответствующего раствора в этаноле и подвергают нисходящей хроматографии в системе: бензол-метанол-вода (5:7:3). Полоску бумаги, соответствующую стандарту диэтилстильбэстрола, вырезают и облучают в УФ-свете для определения месторасположения пятен диэтилстильбэстрола. Найденный

участок хроматограммы с опытной пробой вырезают, измельчают в 10 мл этанола. Элюирование предполагаемого пятна из опытной пробы, содержащей диэтилстильбэстрол, в раствор заканчивается в течение 10 ч. Полученный этанольный раствор, содержащий элюированный из опытной пробы диэтилстильбэстрол упаривают досуха.

ПРОВЕДЕНИЕ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Полученный сухой остаток растворяют в 500 мкл бензола, добавляют 10 мкл ангидрида гептафтормасляного или трифторуксусного, выдерживают смесь при 60 °С в течение 0,5 ч. Смесь высушивают в токе азота, сухой остаток растворяют в 500 мкл бензола и используют для проведения ГЖХ-анализа.

УСЛОВИЯ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

5 мкл бензольного раствора вводят в испаритель газового хроматографа с детектором захвата электронов и анализируют в следующих условиях: колонка хроматографическая стеклянная для газового хроматографа длиной 3,0 м диаметром 3 мм, с наполнением 5% SE-60 на хроматоне N-AW-ГМДС (0,16–0,20 мм), температура испарителя 230 °С, колонки — 190 °С, детектора — 240 °С, газ-носитель — азот, 40 мл/мин. Время выхода пика, соответствующего диэтилстильбэстролу составляет 7 мин.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание диэтилстильбэстрола X мг/кг, в анализируемом сырье вычисляют с использованием автоматической программы обчета хроматографических данных или в соответствии с градуировочным графиком, построенным для стандартных растворов в координатах: концентрация — площадь пика, по формуле:

$$X = m_1 \cdot V_1 / m_2 \cdot V_2,$$

где: m_1 — масса диэтилстильбэстрола, найденная по градуировочному графику, мкг; V_1 — общий объем раствора, из которого взята аликвота для хроматографирования, мл; m_2 — масса анализируемой пробы, г; V_2 — объем аликвоты, вводимой в хроматограф, мкл.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания диэтилстильбэстрола в любой пробе при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов $\pm 0,15X$.

При измерении содержания диэтилстильбэстрола в образцах полнота обнаружения может варьировать в пределах 75–90%.

Минимально обнаруживаемые количества диэтилстильбэстрола с помощью газожидкостной хроматографии составляют 1–10 нг в пробе, что соответствует нижнему пределу измерения — 0,0005 мг/кг.

Значение среднего квадратичного отклонения случайной составляющей погрешности измерений содержания вещества одной и той же пробы в разных лабораториях при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов составляет $\pm 0,20 X$.

Расхождение между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать 40% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ЭСТРАДИОЛА-17 β ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Эстрадиол относится к естественным гормонам — эстрогенам и содержится во многих животных органах и тканях. Превышение его остаточного содержания в продуктах животноводства представляет опасность для здоровья человека. ПДК эстрадиола-17 β установлена на уровне 0,0005 мг/кг.

Метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) основан на экстракции эстрадиола-17 β органическим растворителем, очистке экстракта адсорбционной хроматографией с последующим количественным измерением на газовом хроматографе с детектором захвата электронов.

ОБОРУДОВАНИЕ.

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности. Испаритель ротационный ИР-1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с. Лампа ртутно-кварцевая типа ПРК-4. Колбы перегонные К-1–250–29/32. Колбы Гр-25–14/23. Колбы мерные 2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В-56–80 ХС. Колба коническая Кн-1–250–29/32. Цилиндры мерные 1–50, 1–100. Пробирки

с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Воронки делительные ВД-100–29/32, ВД-250–29/32. Стакан В-1–50. Центрифуга (>5000 G). Термостат на 20–200 °С. Гомогенизатор животной ткани. Пипетки 1–2–2–5, 1–2–2–10. Вата медицинская гигроскопическая. Бумага фильтровальная лабораторная. Колонки стеклянные хроматографические (0,5 × 6 см).

Микропипетки автоматические на 5, 20, 500 и 1000 мкл. Пульверизатор. Камера для хроматографирования: сосуд с плоским дном, закрывающийся шлифованной крышкой, стеклянный.

Газовый хроматограф Газохром 1109 или аналогичный, например типа Varian, с детектором захвата электронов.

Микрошприц МШ 10 или аналогичный для ввода 0,1–10 мкл пробы заклом через мембрану инжектора хроматографа.

Баллон стальной для сжатого газа, номинальное давление 150 ат.

Азот газообразный, марки «особой чистоты» или азот с содержанием кислорода не более 0,004% или гелий.

Колонки хроматографические для газового хроматографа длиной 2,0 м диаметром 3 мм.

Насадки для колонки (наполнение набивных колонок): 3% SE-30 на хроматоне N–AW–ГМДС (0,16–0,20 мм) или капиллярная колонка в соответствии с документацией к газовому хроматографу.

РЕАКТИВЫ

Хлороформ, хч, перегнанный. Эфир диэтиловый медицинский. Спирт этиловый ректификованный, хч. Бензол, хч для хроматографии. Натрий сульфат безводный, хч. Окись алюминия для хроматографии. Серная кислота 20% раствор. Вода дистиллированная. Бумага хроматографическая. Бумага индикаторная универсальная для определения рН. Гептафтормасляный или трифторуксуный ангидрид. Эталон эстрадиола-17 β гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95%.

Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

ПОДГОТОВКА АДсорбЕНТА

Оксид алюминия тонким слоем прокаливают при температуре 200 °С в течение 3 ч. Затем к адсорбенту добавляют 10% об. воды

и встряхивают в течение 0,5 ч. К Al_2O_3 добавляют 20 мл хлороформа, перемешивают и суспензию переносят на колонку и формируют слой $0,5 \times 6$ см. Колонку применяют непосредственно после подготовки. Для подтверждения работоспособности колонки проводят контрольные исследования условий элюции с использованием стандартного 1 мкг/мл раствора эстрадиола-17 β .

ПОДГОТОВКА СИЛИКАГЕЛЯ

Пластины силикагеля 20×20 см с толщиной слоя 0,4 мм перед употреблением активируют прогреванием при 120 °С в течение 1 ч.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГРУДУИРОВОЧНЫХ РАСТВОРОВ ЭСТРАДИОЛА-17 β

Основные градуировочные растворы с массовой концентрацией (0,5–10) мкг/см³ готовят весовым способом путем растворения соответствующей навески эстрадиола-17 β в 96%-ном этаноле, получая растворы с содержанием вещества 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 4 мкг/мл, 8 мкг/мл, 10 мкг/мл. Все растворы стабильны при хранении в колбах с притертыми пробками в холодильнике в течение 1 мес.

ПОДГОТОВКА ГАЗОВОГО ХРОМАТОГРАФА

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ

Сухую стеклянную колонку, предварительно промытую хромовой смесью, этиловым спиртом, затем диэтиловым эфиром, заполняют носителем с помощью вакуумного или водоструйного насоса. При этом набивку колонки периодически уплотняют, постукивая по колонке деревянной палочкой. Установленную в термостате хроматографическую колонку перед работой кондиционируют в следующем режиме: 2 ч при 100 °С; 2 ч при 150 °С; 4 ч при 200 °С; 4 ч при 220 °С. При кондиционировании колонка должна быть отключена от детектора. Кондиционирование следует проводить при смене колонки, а также после длительных перерывов в работе. При использовании капиллярной колонки проводят ее подготовку в соответствии с технической документацией к прибору.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ЭКСТРАКЦИЯ

Из объединенной пробы мяса и субпродуктов отбирают навеску массой 5,0 г, помещают в гомогенизатор, смешивают с 20 мл воды

и гомогенизируют в течение времени достаточном для получения однородной суспензии (2 мин), которую смешивают с 50 мл диэтилового эфира и встряхивают в делительной воронке в течение 0,5 ч. Экстракцию повторяют дважды. Экстракты объединяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия, упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 3 мл хлороформа.

ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА АДСОРБЕНТЕ

Исследуемую пробу в количестве 3 мл хлороформа наносят на колонку $0,5 \times 6$ см с подготовленным оксидом алюминия. Колонку промывают пропусканием 10 мл хлороформа, (фракция 1, не содержащая эстрадиол-17 β), 15 мл 0,5% этанола в хлороформе (фракция 2, не содержащая эстрадиол-17 β), 20 мл 3% этанола в хлороформе (фракция 3, содержащая эстрадиол-17 β).

Фракцию 3, содержащую эстрадиол-17 β , собирают и упаривают на роторном испарителе досуха.

ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Сухой остаток растворяют в 50 мкл смеси этанола с эфиром (3:1) и наносят на хроматографическую пластинку и рядом через 2 см наносят 0,5–1 мкг стандарта эстрадиола-17 β в виде соответствующего раствора в этаноле и подвергают восходящей хроматографии в системе: бензол-этилацетат (2:3).

Пластину высушивают. Участок пластины, на которой проведено хроматографирование опытной пробы закрывают стеклом, а другой участок пластины проявляют опрыскиванием 20%-ным раствором серной кислоты. Слой силикагеля с зоной, соответствующей опытной пробе, вырезают, выделяя скальпелем участок с радиусом в 1 см от центра предполагаемого пятна опытной пробы, снимают его с пластины, переносят в химическую колбу и смешивают с 10 мл смеси этанол-эфир (3:1) и встряхивают в течение 20 мин. Экстракт сливают, элюцию повторяют, отделяя силикагель фильтрованием через бумажный фильтр. Элюаты объединяют и упаривают досуха.

ПРОВЕДЕНИЕ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Полученный сухой остаток растворяют в 500 мкл безводного бензола, добавляют 20 мкл ангидрида гептафтормасляного или трифторуксусного, выдерживают смесь при 65 °С в течение 0,5 ч. Смесь высушивают в токе азота, сухой остаток растворяют в 500 мкл бензола и используют для проведения ГЖХ-анализа.

Освобождение от остатков гептафтормасляного или трифторуксусного ангидрида можно провести отмыванием водой. К 500 мкл реакционной массы прибавляют 300 мкл дистиллированной воды, встряхивают 2 мин и разделяют слои центрифугированием, используя для ГЖХ бензольный слой.

УСЛОВИЯ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

5 мкл бензольного раствора вводят в испаритель газового хроматографа с детектором захвата электронов и анализируют в следующих условиях: колонка хроматографическая стеклянная для газового хроматографа длиной 2,0 м диаметром 3 мм с наполнением 3% SE-30 на хроматоне N-AW-ГМДС (0,16–0,20 мм), температура испарителя 230 °С, колонки — 200 °С, детектора — 240 °С, газ-носитель — азот, 40 мл/мин. Время выхода пика, соответствующего эстрадиолу-17β составляет 7,5 мин.

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание эстрадиола-17β X мг/кг, в анализируемом сырье вычисляют с использованием автоматической программы обсчета хроматографических данных или в соответствии с градуировочным графиком, построенным для стандартных растворов в координатах: концентрация — площадь пика, по формуле:

$$X = m_1 \cdot V_1 / m_2 \cdot V_2,$$

где: m_1 — масса эстрадиола-17β, найденная по градуировочному графику, мкг; V_1 — общий объем раствора, из которого взята аликвота для хроматографирования, мл; m_2 — масса анализируемой пробы, г; V_2 — объем аликвоты, вводимой в хроматограф, мкл.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания гормонов в любой пробе при допустимых методикой изменениях влияющих факторов $\pm 0,15X$.

При измерении содержания эстрадиола-17β в образцах полнота обнаружения может варьировать в пределах 70–90%.

Минимально обнаруживаемые количества эстрадиола-17β с помощью газожидкостной хроматографии составляют 0,1–0,2 нг стероида в пробе, что соответствует нижнему пределу измерения — 0,0002 мг/кг.

Значение среднего квадратичного отклонения случайной составляющей погрешности измерений содержания вещества одной и той же пробы в разных лабораториях при допустимых методикой изменениях влияющих факторов составляет $\pm 0,20X$.

Расхождение между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать 30% по отношению к среднему арифметическому при $p = 0,95$.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ К ГЛАВЕ 9

1. Опасность гормональных регуляторов. Уровень содержания. Почему определение количественного содержания остаточных микропримесей является важной аналитической задачей подтверждения безопасности продукции?

2. Какова точность определения содержания витаминов, гормонов различными методами?

3. Как согласуется безопасный уровень содержания конкретного вещества и границы диапазона аналитического определения?

4. Как влияет на тонность определения аналита использование инструментальных методов анализа?

5. Почему нужен аналитический контроль за содержанием витаминов, гормонов и др. веществ в объектах природного происхождения?

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 9

Букин, В. Н. Витамины. Изд. 2-е, доп. — М.: Пищепромиздат, 2014. — 472 с.

Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / Под ред. И. М. Скурихина, В.А Тутельяна. — М.: Брандес — Медицина, 1998. — 341 с.

Methods in food analysis / Ed. M. A. Joslyn. — N.Y.: Acad. Press, 2019. — 720 p.

Справочник биохимика: Пер. с англ./Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. — М.: Мир, 1991. — 544 с.

Нечаев, А. П., Скурихин, И. М. Все о пище с точки зрения химика. — М.: Высшая школа, 1991. — 287 с.

Химический состав пищевых продуктов: Книга 1: Справочные таблицы содержания основных пищевых веществ и энергетической ценности пищевых продуктов/ Под ред. И. М. Скурихина и М. Н. Волгарева. — М.: Агропромиздат, 1987. — 224 с.

Заключение

Современная аналитическая химия — это важнейшая область человеческой деятельности, обеспечивающая надлежащий уровень безопасности и качества различных объектов, которые находятся в контакте с человеком.

В данной книге собраны реально работающие методы и методики анализа неорганических и органических соединений. Данные методы широко применяются в практической работе в научных исследованиях, в лабораториях, занимающихся сертификацией продукции, а также в исследовательских центрах университетов.

Основной акцент сделан на методах исследований, связанных с материалами природного происхождения, важнейшими из которых для человека — всегда были объекты пищевого назначения.

Экспериментально-практическое, обучение студентов вопросам аналитической химии является эффективным способом подготовки высокообразованных специалистов, чему может способствовать данная книга.

Иванкин Андрей Николаевич
Олиференко Галина Львовна
Олиференко Галина Львовна
АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Учебное пособие

Редактор *Н.А. Смирнова*
Корректор *Н.С. Орлова*
Верстка *М.С. Коротковых*
Дизайн обложки *О.Н. Ганиной*