Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

В. В. Соклаков, Н. А. Рачкова

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ
Часть 1
ТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ИЗ ВОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ

Учебно-методическое пособие по лабораторным работам для студентов
высших учебных заведений, обучающихся в магистратуре
по направлению подготовки
19.04.03 – Продукты питания животного происхождения

Калининград
Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ»
2021

УДК 542:664.95

РЕЦЕНЗЕНТЫ:
канд. хим. наук., доцент кафедры химии ФГБОУ ВО «КГТУ» А. Г. Булычев
канд. техн. наук, доцент кафедры технологии продуктов питания
ФГБОУ ВО «КГТУ» М. Н. Альшевская

Соклаков, В. В., Рачкова, Н. А. Методы исследований в технологии продуктов питания. Часть 1. Технология продуктов из водных биологических ресурсов: учеб.-методич. пособие по лабораторным работам для студ. высших учебных заведений, обучающихся в магистратуре по напр. подгот. 19.04.03 – Продукты питания животного происхождения. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2021. – 33 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с требованиями ФГОС поколения 3++ и является руководством по проведению цикла лабораторных работ по методам исследований в технологии продуктов из водных биологических ресурсов студентами, обучающимися по направлению подготовки 19.04.03 – Продукты питания животного происхождения. Лабораторные работы предназначены для закрепления теоретического материала о принципах, лежащих в основе методов исследования продуктов питания, а также для овладевания методами пробоподготовки и современными методиками лабораторных исследований показателей сырья водного происхождения, используемых при переработке материалов и продукции из гидробионтов с использованием современной аппаратуры, навыками применения критериев повторяемости и представления статистически достоверных результатов проведенных лабораторных исследований.

Рис. 8, список лит. – 28 наименований

Учебно-методическое пособие рассмотрено и одобрено методической комиссией механико-технологического факультета ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 17 ноября 2020 г., протокол № 04

Учебно-методическое пособие рассмотрено и одобрено кафедрой технологии продуктов питания ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 09 ноября 2020 г., протокол № 03

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет», 2021 г.
© Соклаков В. В., Рачкова Н. А., 2021 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Общие положения к лабораторному практикуму 4
Лабораторная работа № 1 Гравиметрические методы определения содержания влаги 5
Лабораторная работа № 2 Титриметрические методы определения показателей свежести и безопасности 7
Лабораторная работа № 3 Рефрактометрический метод определения содержания жира 9
Лабораторная работа № 4 Изучение атомно-абсорбционного метода определения содержания токсичных элементов 11
Лабораторная работа № 5 Уф-спектрометрический метод определения содержания каротиноидов 14
Лабораторная работа № 6 Изучение радиометрического метода определения активности радионуклидов 16
Лабораторная работа № 7 Потенциометрический метод определения показателей качества 18
Лабораторная работа № 8 Изучение газохроматографического метода определения содержания полихлорированных бифенилов 20
Лабораторная работа № 9 Определение содержания синтетических красителей методом тонкослойной хроматографии 24
Лабораторная работа № 10 Изучение иммуноферментного метода определения содержания красителей 27
Лабораторная работа № 11 Изучение применения полимеразной цепной реакции для определения патогенных микроорганизмов 29
Список литературы 31

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ

Если не указано иное, работы выполняются индивидуально или группами по два человека. Условно все работы лабораторного практикума делятся на две группы:

- в ходе которых происходит непосредственное освоение методов исследований пищевой продукции,
- в ходе которых происходит теоретическое изучение методов исследований.

Непосредственное освоение методов исследований осуществляется с помощью стандартизированных методик, обладающих приписанными метрологическими характеристиками. Перед непосредственным выполнением таких работ проводится тестирование с целью активизации учебной работы и оценки багажа имеющихся знаний, приобретенных при изучении связанных дисциплин бакалавриата и магистратуры и при усвоении текущего лекционного материала настоящей дисциплины. К практическому выполнению лабораторных работ студент допускается только после демонстрации понимания сути проводимых манипуляций. В ходе работы в лабораторном журнале студент должен фиксировать все необходимые переменные, участвующие в расчетах. Оформленная работа по итогам выполнения должна содержать:

- дату проведения испытаний;
- идентификацию исследованного образца (включая, если возможно, производителя, массу нетто, вид тары, нормативный документ, по которому образец был произведен);
- обозначение использованной методики выполнения измерений;
- первичные данные, полученные в ходе работы (с расшифровкой их обозначений);
- итоговый результат измерений с точностью, предусмотренной методикой выполнения измерений;
- критерий повторяемости;
- вывод исходя из указаний к конкретной лабораторной работе.

При теоретическом изучении методов исследований тестирование с целью оценки багажа имеющихся знаний проводится при защите выполненной работы. Оформленная работа по итогам выполнения должна содержать конспектированный алгоритм проведения испытаний, включающий:

- последовательность всех этапов проведения работы;
- используемые материалы и реактивы;
- используемые лабораторную посуду и оборудование;
- формулы химических реакций (если возможно).

Оценка результатов выполнения заданий по каждой лабораторной работе производится при представлении студентом отчета по ней, демонстрирующего преподавателю исполнение задания, при этом учитываются развернутые ответы студента на контрольные вопросы по тематике лабораторной работы, полученные в ходе тестирования. Студент, полностью и без ошибок выполнивший задание, продемонстрировавший знание и понимание использованных им средств

и приемов исследований, а при непосредственном освоении методов исследований также получивший фактический результат анализа с использованием параллельных измерений, расхождение между которыми не превышает трех пределов приписанной повторяемости методики, получает по лабораторной работе оценку «зачтено».

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1
ГРАВИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ВЛАГИ

Цель лабораторной работы: формирование знаний и навыков в области гравиметрического анализа.

Задание: освоить стандартизированные методики определения содержания влаги. Предполагаются следующие варианты образцов для исследований и соответствующих им методик испытаний:

- вяленая пищевая рыбная продукция – ускоренным методом по п. 3.3.2 ГОСТ 7636 и высушиванием на приборе ВЧМ по п. 3.3.4 ГОСТ 7636;
- пищевая рыбная продукция холодного копчения – с применением тех же методик.

Аппаратура, материалы и реактивы – согласно стандартизированным методикам.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

Задание различается видом или ассортиментной группой пищевой рыбной продукции, или биологическим видом сырья, при этом для определения содержания влаги применяются обе осваиваемые методики. Работа выполняется в последовательности, определяемой используемыми стандартизированными методиками испытаний.

Полученный результат исследований сравнивается со значением, предусмотренным нормативно-технической документацией на исследуемый образец, а также между собой сравниваются результаты, полученные для одного и того же образца с применением различных методик. Делается вывод о степени соответствия образца установленным требованиям в отношении массовой доли влаги и о степени и причине расхождения результатов, полученных с применением различных методик определения для одного и того же образца.

Теоретическая часть.

Гравиметрический (или весовой) анализ – метод количественного химического анализа, основанный на точном измерении массы определяемого компонента пробы, выделяемого в элементарном виде либо в виде устойчивого конечного соединения известного состава, в которое полностью переведен определяемый компонент.

Гравиметрические методы подразделяют на две группы: методы отгонки и методы осаждения.

Теоретический базис метода составляют законы:

- сохранения массы веществ – сумма масс всех веществ, вступивших в эту реакцию, равна сумме масс всех продуктов реакции;
- постоянства состава веществ - любое определенное химически чистое соединение, независимо от способа его получения, состоит из одних и тех же химических элементов, причем отношения их масс постоянны, а относительные числа их атомов выражаются целыми числами;
- закон эквивалентов (для методов осаждения) – все вещества реагируют и образуются в эквивалентных соотношениях.

Изучаемые в данной работе методики можно отнести к методам отгонки, которые предусматривают непосредственное определение массы интересующего отгоняемого компонента. В методах косвенной отгонки летучий компонент отгоняют из навески исследуемой пробы и по уменьшению ее массы рассчитывают его содержание.

Одним из преимуществ весовых определений является отсутствие потребности в приготовлении стандартных растворов и построении калибровочных зависимостей для измерительного оборудования.

Весовой метод анализа очень точен, но продолжителен, из-за чего классические методики часто используют в качестве арбитражных. Точность анализа ограничивается точностью определения массы и полнотой образования и выделения чистого вещества.

В исследовании пищевых рыбных продуктов гравиметрический метод применяется для определения массовой доли жира, золы, сульфатов, содержания примесей, неомыляемых и нерастворимых веществ, агара, растворимости белка в воде, но чаще всего – массовой доли влаги или сухих веществ.

Классификация форм связи влаги с материалом предложена П. А. Ребиндером, согласно которому она может быть химической, физико-химической и физико-механической.

Химически связанная влага наиболее прочно связана с субстратом в стехиометрических соотношениях и может быть удалена только при высокотемпературном нагревании материалов или в результате химических реакций.

Физико-химически связанная влага, в свою очередь, делится на адсорбционно связанную и осмотически связанную. Адсорбционно связанная влага прочно удерживается на поверхности и в порах субстрата, требуя для своего удаления больших затрат энергии, нежели для осмотически связанной, находящейся внутри клеток субстрата и удерживаемой осмотическими связями.

Физико-механическая влага, в свою очередь, делится на влагу макрокапилляров и влагу микрокапилляров. Макрокапилляры заполняются влагой при непосредственном соприкосновении ее с субстратом, что делает возможным ее удаление даже физическими способами. Микрокапилляры (диаметром порядка 10^{-5} см) заполняются как при непосредственном соприкосновении с влагой, так и за счет поглощения ее из окружающей среды, в связи с чем такая форма связи представляется более прочной.

Контрольные вопросы

1. На какие группы делятся методы лабораторных испытаний в зависимости от назначения?

2. Почему арбитражные методы испытаний предполагают высушивание пробы при температуре 100–105 °С?

3. Какой принцип лежит в основе определения массовой доли влаги на приборе Чижовой?

4. Что характеризует повторяемость результатов лабораторных испытаний?

5. Каковы действия исследователя, если полученные при испытаниях результаты не удовлетворяют критерию повторяемости?

6. Какой тип нормативного акта определяет требования безопасности к сырью и продукции из водных биологических ресурсов?

7. Какие существуют типы влаги по степени ассоциации с продуктом?

8. Каким образом определяется окончание исследования при использовании арбитражного метода?

9. Что является фактором, определяющим точность, с которой представляется итоговый результат исследования?

10. Какое значение имеет характер связи влаги с продуктом для процессов, определяющих сроки хранения продукции?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2
ТИТРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВЕЖЕСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ

Цель лабораторной работы: формирование знаний и навыков в области титриметрического анализа.

Задание: освоить стандартизированные методики определения содержания:

- азота летучих оснований в охлажденной или мороженой (непереработанной) пищевой рыбной продукции – по п. 3.2.1 ГОСТ 7636;
- кислотного числа жира пищевого из гидробионтов – по п. 7.9 ГОСТ 7636;
- перекисного числа жира пищевого из гидробионтов – по п. 7.12 ГОСТ 7636.

Аппаратура, материалы и реактивы – согласно используемой стандартизированной методике. При определении азота летучих оснований допускается проводить отгонку полуавтоматическим способом с применением анализатора белка по Кьельдалю VELP UDK 127.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

Задание различается видом осваиваемой методики, видом пищевой рыб-

ной продукции или биологическим видом сырья. Работа выполняется в последовательности, определяемой используемой стандартизированной методикой испытаний.

Полученный результат исследований сравнивается со значениями, регламентируемыми ТР ЕАЭС 040/2016. Делается вывод о степени соответствия образца установленным требованиям в отношении:

- для непереработанной рыбной продукции – показателя свежести;
- для жира пищевого из гидробионтов – показателей безопасности.

Теоретическая часть.

Титриметрический (или объемный) анализ – метод количественного химического анализа, основанный на точном измерении объема раствора вещества известной концентрации (титранта), эквимолярно вступающего в химическую реакцию с определяемым веществом. Как правило, точка эквивалентности совпадает с точкой окончания титрования, регистрацию которой осуществляют по изменению свойств титруемого раствора – например, по изменению цвета или иных физико-химических характеристик.

Теоретический базис метода составляет закон эквивалентов.

Титриметрические методы классифицируют в зависимости от типа химической реакции, лежащего в их основе: нейтрализации, осаждения, комплексообразования и окисления-восстановления. По способу осуществления титрование может быть прямым – когда непосредственно титруется определяемое вещество; обратным – когда титруется избыток добавленного реагента, вступающего в реакцию с определяемым веществом; заместительным – когда титруется продукт реакции определяемого вещества и добавленного в избытке реагирующего с ним соединения.

Точку эквивалентности при кислотно-основном титровании (нейтрализации) определяют по изменению цвета добавляемых к реакционной смеси индикаторов – веществ, являющихся слабыми органическими кислотами или основаниями, у которых неионизированные молекулы и ионы имеют разную окраску, либо содержащих атомные группы, способные изменять окраску при внутримолекулярной перегруппировке.

Одним из преимуществ объемных определений является их скорость: продолжительность операции титрования не превышает 10 мин.

Объемный метод анализа по точности проигрывает весовому. Точность классического титриметрического анализа зависит от точности измерения объемов испытуемого раствора и титранта, а также от точности определения изменения цвета титруемого раствора, которая, в свою очередь, может быть обусловлена физиологическими особенностями аналитика.

В стандартизированных методиках титриметрического анализа используются следующие способы выражения концентрации растворов:

- массовая доля – отношение массы растворенного вещества к массе раствора;
- молярность – количество растворенного вещества, содержащееся в 1 $дм^3$ раствора;

- нормальность – количество грамм-эквивалентов растворенного вещества, содержащееся в 1дм^3 раствора;

- титр – отношение массы растворенного вещества к объему раствора.

В исследовании пищевых рыбных продуктов титриметрический метод применяется для определения массовой доли белка, хитина, альгиновой кислоты, содержания различных форм азота, муравьиной кислоты, бензоата натрия, хлорида натрия, карбоната кальция, кальция, йода, уровня кислотности, буферности, кислотного, йодного, перекисного чисел, числа омыления.

Контрольные вопросы

1. Каким образом можно классифицировать рассматриваемые методики по типу реакции и способу титрования, лежащим в их основе?
2. Напишите химические реакции, лежащие в основе рассматриваемых методик.
3. Для чего при определении азота летучих оснований в пробу вносят оксид магния?
4. Каким образом при определении азота летучих оснований устанавливают окончание дистилляции?
5. Каким образом при определении азота летучих оснований устанавливают точку эквивалентности при титровании дистиллята?
6. Почему для растворения пробы при определении кислотного числа используется именно спирто-эфирная смесь?
7. Почему при определении перекисного числа используется именно насыщенный раствор йодистого калия?
8. Каким документом определяются методы исследований, допустимые для использования в целях подтверждения соответствия пищевой рыбной продукции?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3
РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРА

Цель лабораторной работы: формирование знаний и навыков в области рефрактометрического анализа.

Задание: освоить стандартизированную методику определения массовой доли жира. Предполагаются следующие варианты образцов для исследований и соответствующих им методик испытаний:

- икорные рыбные изделия – по п. 3.7.4 ГОСТ 7636;
- пищевая рыбная продукция горячего копчения – с применением той же методики;
- пресервы, не содержащие в заливке масло, – по п. 5 ГОСТ 26829.

Аппаратура, материалы и реактивы – согласно стандартизированным методикам.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

Задание различается видом осваиваемой методики, видом или ассортиментной группой пищевой рыбной продукции, или биологическим видом сырья. Работа выполняется в последовательности, определяемой указанной стандартизированной методикой испытаний.

Полученный результат исследований сравнивается со значением, вынесенным на маркировку продукции. Делается вывод о степени соответствия информации на маркировке в части показателя пищевой ценности.

Теоретическая часть.

Рефрактометрический анализ – метод физического анализа, основанный на явлении преломления светового потока при переходе из одной среды в другую. Показатель преломления – отношение синусов угла падения луча света и угла его преломления – зависит от длины световой волны, температуры, природы растворителя и т. д. За стандартные (нормальные) условия измерения водных растворов принимаются температура 20±5 °С и длина волны 598,3 нм (спектр натрия), если в методике не указано иное. При невозможности обеспечить требуемую температуру измерений вводят температурные поправки.

Теоретический базис метода составляет закон Лоренца – Лорентца, описывающий зависимость молярной рефракции вещества (R_M) от его плотности (d) и характера изменения показателя преломления (n):

$$R_M = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\frac{M}{d}, \qquad (1)$$

где М – молярная масса вещества.

Основными компонентами рефрактометра (рис. 1) являются зеркало, система призм, между которыми наносится исследуемый образец, компенсатор дисперсии и объектив с окуляром и шкалой показателей преломления.

Правильность показаний шкалы рефрактометра проверяют при помощи дистиллированной воды, показатель преломления которой $n_D^{20} = 1{,}3330$.

Для определения концентрации вещества в двухкомпонентной смеси методом рефрактометрии строят калибровочную зависимость показателя преломления при стандартной температуре от концентрации исследуемого вещества, используя для этого смеси стандартных растворов химически чистых веществ различных концентраций.

Чувствительность рефрактометрического метода составляет 0,001–0,01 %.

В исследовании пищевых рыбных продуктов рефрактометрический метод применяется для определения массовой доли жира и его показателя преломления.

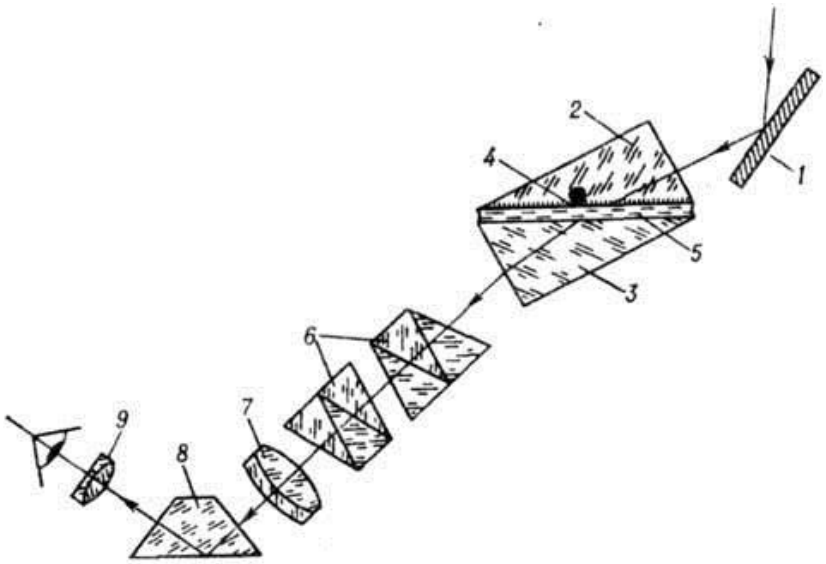

Рис. 1. Схема рефрактометра типа RL:
1 – осветительное зеркало, 2 – осветительная (откидная) призма, 3 – основная (измерительная) призма, 4 – матированная грань осветительной призмы, 5 – исследуемая проба, 6 – призмы компенсатора, 7 – объектив зрительной трубы, 8 – поворотная призма, 9 – окуляр зрительной трубы

Контрольные вопросы

1. Какие методы подготовки проб к анализу использованы в рассматриваемом методе?
2. При какой температуре пробы проводятся измерения?
3. По какому растворителю проверяется градуировка рефрактометра?
4. Какое физическое явление лежит в основе работы рефрактометра?
5. В чем смысл температурной поправки?
6. В каком случае допускается не учитывать при измерениях температурную поправку?
7. С какой целью проводят определение показателя преломления чистого растворителя?
8. Каковы приписанные метрологические характеристики изученной методики?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4
ИЗУЧЕНИЕ АТОМНО-АБСОРБЦИОННОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Цель лабораторной работы: формирование знаний в области атомно-абсорбционного спектрометрического анализа.

Задание: изучить стандартизированные методики определения содержания следующих токсичных элементов и соответствующих методик испытаний:

- свинца и кадмия – по ГОСТ 30178;

- мышьяка – по ГОСТ 31707;
- ртути – по п. 3 ГОСТ 26927.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

Задание различается изучаемой методикой испытаний.

Теоретическая часть.

Метод абсорбционной спектроскопии основан на избирательном поглощении свободными атомами электромагнитного излучения в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях спектра. Перевод пробы в атомный пар осуществляется с помощью атомизатора – источника высокой температуры.

Теоретический базис метода составляет объединенный закон Бугера–Ламберта–Бера, применительно к данному методу упрощаемый до пропорциональной зависимости поглощения атомного пара (А) от концентрации атомов определяемого элемента (С) в исследуемой пробе:

$$A = kbC \ , \qquad (2)$$

где k – коэффициент атомного поглощения, b – толщина поглощающего слоя.

Даже при сравнительно высоких температурах в атомизаторе (2000–3000 °С) большинство атомов остается в невозбужденном состоянии, поэтому в атомно-абсорбционной спектроскопии используются оптические переходы между основным и первыми возбужденными уровнями (резонансные уровни). Линии поглощения свободных атомов имеют спектральную ширину 10^{-2} нм, что требует использования высокомонохроматичных мощных источников первичного излучения, в качестве которых традиционно выступают лампы с полым катодом и безэлектродные разрядные лампы. Атомизация осуществляется пламенным (используется смесь горючего газа и окислителя) или электротермическим (графитовая трубчатая печь) методами. Получаемый при этом спектр можно использовать для идентификации химического элемента и количественного определения его содержания. Спектральные данные регистрируют как зависимость фактора интенсивности (поглощения) от длины волны. Характер спектра поглощения дает информацию об элементном составе вещества (качественный анализ), а интенсивность поглощения –о его концентрации (количественный анализ).

Основными компонентами АА-спектрометра (рис. 2) являются источник первичного излучения, атомизатор, монохроматор, усилитель и регистратор сигнала. В зависимости от того, как световой луч проходит путь от источника излучения сквозь образец до детектора, конструктивно различают одно- и двулучевые АА-спектрометры.

В практике исследования пищевых продуктов в качестве горючих газов, как правило, используются ацетилен и водород, а в качестве газов-окислителей – воздух и оксид диазота.

Для определения неизвестной концентрации определяемого элемента в пробе вещества методом АА-спектроскопии сначала строят калибровочную зависимость, для чего измеряют поглощение света несколькими эталонными растворами определяемого элемента различных известных концентраций.

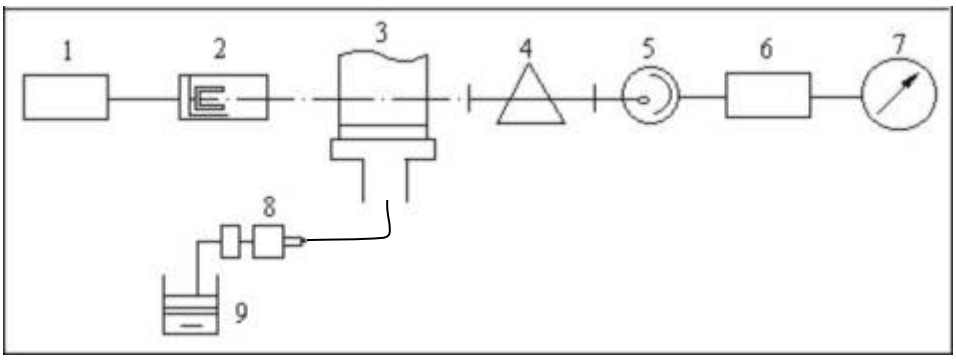

Рис. 2. Схема атомно-абсорбционного спектрометра:
1 – источник питания, 2 – источник излучения, 3 – атомизатор,
4 – монохроматор, 5 – фотоумножитель, 6 – усилитель, 7 - дисплей,
8 – распылитель, 9 – анализируемый раствор

Нижний предел определения концентраций элементов зависит от способа атомизации и составляет от 10^{-4} % для пламенного и 10^{-6} % для электротермического вариантов, а погрешность – соответственно 0,5 – 3,0 и 2 – 5 %.

В исследовании пищевых рыбных продуктов атомно-абсорбционная спектрометрия применяется для определения содержания железа, кадмия, калия, магния, марганца, меди, молибдена, мышьяка, натрия, олова, ртути, свинца, селена, хрома, цинка.

Контрольные вопросы

1. Какие способы подготовки проб к анализу использованы в изученном методе определения массовой доли токсичных элементов?

2. В чем заключается разница между явлениями, лежащими в основах атомно-абсорбционной и УФ-спектрометрии?

3. Какой горючий газ используется в рассматриваемом методе?

4. Что используют в качестве источника резонансного излучения?

5. Для чего прогревают источник резонансного излучения перед началом измерений?

6. От чего зависит выбор резонансной линии для конкретного определяемого элемента?

7. Для чего устанавливают предел обнаружения для серии измерений?

8. Установленное в ходе однократного измерения содержание свинца в исследуемой пробе – 0,14 мг/кг. Приведите значение параллельного определения, которое удовлетворяет требованиям повторяемости. Представьте окончательный результат испытаний с учетом приведенного значения параллельного определения.

9. Установленное в ходе однократного измерения содержание ртути в исследуемой пробе – 0,008 мг/кг. Приведите значение параллельного определения, которое удовлетворяет требованиям повторяемости. Представьте окончательный результат испытаний с учетом приведенного значения параллельного определения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5
УФ-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАРОТИНОИДОВ

Цель лабораторной работы: формирование знаний и навыков в области УФ-спектрометрического анализа.

Задание: освоить стандартизированную методику определения содержания общих каротиноидов. Предполагается использование образцов обогащенной или функциональной пищевой рыбной продукции для исследований, а в качестве методики испытаний – ГОСТ Р 54058.

Аппаратура, материалы и реактивы – согласно стандартизированной методике. Допускается проведение измерений на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 440 нм.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

Задание различается видом или ассортиментной группой пищевой рыбной продукции, или биологическим видом сырья. Работа выполнятся в последовательности, определяемой указанной стандартизированной методикой испытаний.

Полученный результат исследований сравнивается со значением, предусмотренным нормативно-технической документацией на исследуемый образец (при ее доступности), а также с нормами, предусмотренными в определении обогащенной продукции по ТР ТС 021/2011, и с рекомендуемыми уровнями потребления пищевых и биологически активных веществ в соответствии с МР 2.3.1.1915. Делается вывод о степени соответствия образца установленным требованиям.

Теоретическая часть.

УФ-спектрометрический анализ – метод физического анализа, основанный на поглощении молекулами вещества излучения в ультрафиолетовой части спектра. Получаемый при этом спектр можно использовать для идентификации образца и количественного определения его содержания. Спектральные данные регистрируют как зависимость фактора интенсивности (поглощения, пропускания или оптической плотности) от длины волны. Положение пиков спектра дает информацию о молекулярной структуре вещества (качественный анализ), а высота пиков – информацию о его концентрации (количественный анализ).

Теоретический базис метода составляют закон Бугера–Ламберта, описывающий связь поглощательной способности вещества (оптической плотности, D) с толщиной его слоя (d), и закон Бера, описывающий связь поглощательной способности вещества с его концентрацией (C):

$$D = kd\ , \qquad (3)$$

$$D = \varepsilon C d\ , \qquad (4)$$

где k – линейный коэффициент поглощения света веществом, ε – молярный показатель поглощения.

Закон Бугера–Ламберта является универсальным в отличие от закона Бера, отклонения от которого связаны с межмолекулярными взаимодействиями в растворах веществ.

УФ-спектрофотометр измеряет интенсивность света, проходящего сквозь раствор образца в кювете, и сравнивает его с интенсивностью света до его прохождения сквозь образец. Основными компонентами УФ-спектрофотометра (рис. 3) являются источник света, держатель образца, устройство рассеяния для разделения света с разными длинами волн (например, монохроматор) и подходящий детектор. В зависимости от того, как световой луч проходит путь от источника излучения сквозь образец до детектора, конструктивно различают одно- и двулучевые УФ-спектрометры.

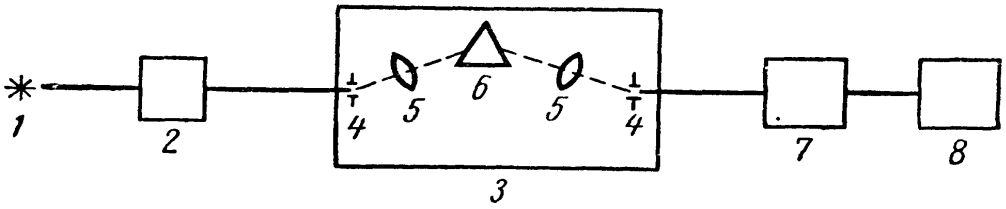

Рис. 3. Схема прибора для молекулярного спектрального анализа:
1 – источник излучения, 2 – держатель образца, 3 – монохроматор, 4 – входная и выходная щели монохроматора, 5 – фокусировка оптики, 6 – диспергирующая оптика (призма или дифракционная решетка), 7 – детектор (приемник излучения), 8 – регистрирующее устройство

В практике исследования пищевых продуктов измерения проводятся в так называемой средней ультрафиолетовой области (длина волны 185 – 400 нм) с использованием кварцевой оптики, водородной или ксеноновой лампы в качестве источника излучения и фотоэлементов в качестве детектора.

Для определения неизвестной концентрации раствора вещества методом УФ-спектроскопии строят калибровочную зависимость, принцип построения которой аналогичен калибровочной зависимости при АА-спектроскопии.

Помимо качественных и количественных определений вещества спектрометрические методы позволяют исследовать процессы комплексообразования.

Чувствительность УФ-спектроскопического метода составляет $10^{-5} – 10^{-7}$ моль/дм^3.

В исследовании пищевых рыбных продуктов УФ-спектроскопия применяется для определения содержания маннита, каротиноидов, аммиака, фосфатов, бензоата натрия, алюминия.

Контрольные вопросы

1. Какой физический закон лежит в основе количественных фотометрических определений?

2. Почему количественное определение вещества при УФ-спектрометрии производят при конкретной длине волны?

3. Какие материалы для изготовления кювет используют при спектрометрии?

4. В чем отличие принципа работы одно- и двухлучевого УФ-спектрофотометров?

5. Почему один и тот же метод УФ-спектрометрического исследования в рамках диапазона определений может предполагать несколько поддиапазонов, каждый из которых характеризуется своими показателями точности и прецизионности?

6. С какой целью в рассматриваемом методе к пробе добавляют растворы Карреза?

7. Для чего используется петролейный эфир в рассматриваемом методе?

8. Для чего используется кювета с холостым раствором при спектрометрии?

9. Что такое калибровочный график, и для чего он используется?

10. Почему рассмотренная методика определения содержания каротиноидов не предполагает использование калибровочного графика?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6
ИЗУЧЕНИЕ РАДИОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ РАДИОНУКЛИДОВ

Цель лабораторной работы: формирование знаний в области радиометрического анализа.

Задание: изучить стандартизированные методики определения содержания следующих радиоизотопов и соответствующих методик испытаний:

- Cs-137 – по ГОСТ 32161;
- Sr-90 – по ГОСТ 32163.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

Задание различается изучаемой методикой испытаний.

Теоретическая часть.

Радиометрия (применительно к анализу пищевых продуктов) – это раздел радиологии, разрабатывающий и использующий методы радиологических исследований. Основу таких исследований составляют испытания по определению содержания глобальных изотопных загрязнений антропогенного характера – ^{137}Cs и ^{90}Sr, а также – для питьевой воды – природных изотопов, приоритетным объектом среди которых является ^{222}Rn, включая их удельные суммарные α- и β-активности.

Теоретический базис метода составляет закон радиоактивного распада, на основании которого определяют объемную (A_V) и удельную (A_m) активности:

$$A = \frac{\ln 2}{T_{½}} \frac{m}{M} N_A \ , \quad (5)$$

$$A_v = \frac{A}{V} \ , \quad (6)$$

$$A_m = \frac{A}{m_в} \ , \quad (7)$$

где A – активность радионуклида, $T_{½}$ - период полураспада, m – масса радионуклидов, M – молярная масса, N_A – постоянная Авогадро, V – объем вещества, $m_в$ – масса вещества.

Метод сцинтилляционной радиометрии основан на регистрации вспышек света, возникающих в результате взаимодействия радиоактивного излучения с веществами, называемыми люминофорами. Такие вспышки регистрируются с помощью светочувствительных устройств, на выходе которых образуются электрические импульсы, после усиления и формирования регистрируемые электронной аппаратурой.

Основными компонентами сцинтилляционного спектрометра (рис. 4) являются сцинтиллятор, фотоэлектронный умножитель, спектрометрический усилитель, анализатор и регистратор сигнала. При попадании частиц в вещество

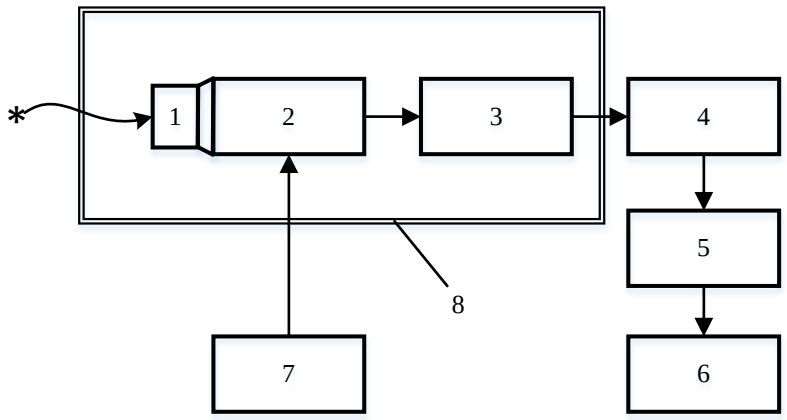

Рисунок 4. Схема сцинтилляционного спектрометра:
1 – сцинтиллятор, 2 – фотоэлектронный умножитель, 3 – эмиттерный повторитель, 4 – спектрометрический усилитель, 5 – анализирующее устройство (амплитудный анализатор), 6 – регистрирующее устройство, 7 – стабилизатор напряжения, 8 – светонепроницаемый кожух

сцинтиллятора в нем возникают световые вспышки, интенсивность которых пропорциональна потраченной частицей в сцинтилляторе энергии. Анализ амплитуд импульсов и энергии регистрируемых частиц осуществляется амплитудными анализаторами. В настоящее время используются комбинированные двухдетекторные радиометры для измерения смешанного γ-β-излучения, в которых используются раздельные сцинтилляционные блоки для детектирования γ-излучения и β-излучения.

Контрольные вопросы

1. Какие способы увеличения чувствительности методов измерения предполагают изученные методики?

2. Почему для сушеных рыбных продуктов допускается использование чашек Петри вместо сосудов Маринелли?

3. Почему рассматриваемый метод не предполагает проведение параллельных измерений пробы?

4. Установленные в ходе измерения в исследуемой пробе удельные активности ^{137}Cs – 62 Бк/кг, ^{90}Sr – 48 Бк/кг. Приведите значение неопределенности определения, при котором проба будет безусловно удовлетворять критерию радиационной безопасности.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7
ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА

Цель лабораторной работы: формирование знаний и навыков в области потенциометрического анализа.

Задание: освоить стандартизированные методики определения:
- буферности пресервов – по п. 6 ГОСТ 19182;
- кислотности пресервов и рыбных консервов – по п. 5 ГОСТ 27082.

Аппаратура, материалы и реактивы – согласно используемым стандартизированным методикам.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

Задание различается видом осваиваемой методики, видом или ассортиментной группой пищевой рыбной продукции, или биологическим видом сырья. Работа выполнятся в последовательности, определяемой используемой стандартизированной методикой испытаний.

Полученный результат исследований сравнивается со значением, предусмотренным нормативно-технической документацией на исследуемый образец (при ее доступности), а также с научными данными, характеризующими степень созревания пресервов. Делается вывод о степени соответствия образца установленным требованиям и – по показателю созревания пресервов – определению в ТР ЕАЭС 040/2016.

Теоретическая часть.

Потенциометрический анализ – метод физического анализа, основанный на измерении ЭДС обратимых электрохимических цепей при потенциале рабочего электрода, близком к равновесному значению.

Теоретический базис метода составляет закон Нернста, описывающий связь электродного потенциала раствора (Е) с зарядом и активностью потенци-

алопределяющего иона (E°). Поскольку коэффициент активности ионов в разбавленных растворах близок к единице, то электродный потенциал будет пропорционален концентрации потенциалопределяющего иона (C):

$$E = E° + \frac{0{,}058}{n} \lg C \ , \qquad (8)$$

где n – заряд потенциалопределяющего иона.

Потенциометр измеряет электродный потенциал, величина которого обусловлена активностью потенциалопределяющего компонента раствора. Помимо самого потенциометра в используемую измерительную систему входят электрод сравнения (например, хлоридсеребряный), измерительный электрод (обладающий селективностью в отношении потенциалопределяющего иона – например, H^+, K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^-, NO_3^-, CN^-) и термокомпенсатор для учета влияния температуры на электродный потенциал исследуемого раствора.

Потенциометрические методы разделяют на две группы: прямой потенциометрии (ионометрии) и косвенной потенциометрии (потенциометрического титрования) (рис. 5).

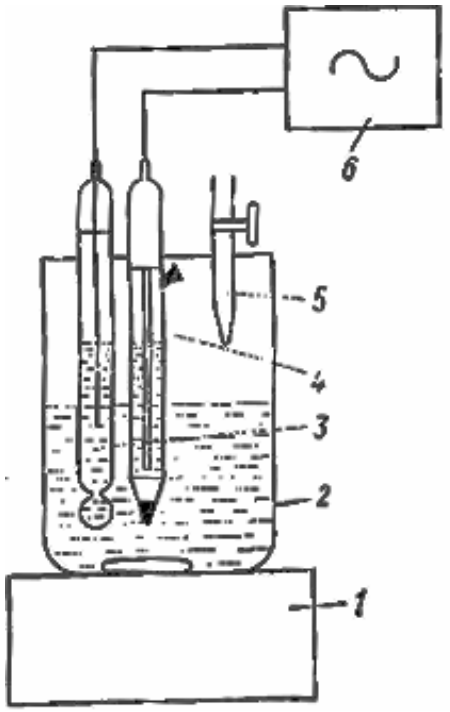

Рисунок 5. Схема установки для потенциометрического титрования:
1 – магнитная мешалка, 2 – ячейка для титрования, 3 – измерительный электрод, 4 – электрод сравнения, 5 – бюретка, 6 – иономер

При потенциометрическом титровании задачей аналитика является определение точки эквивалентности по достижении раствором заранее определенного значения потенциала или по резкому изменению его значения. При графическом определении точки эквивалентности она соответствует перегибу на кривой потенциометрического титрования в координатах pK (отрицательный десятичный логарифм молярной концентрации вещества) – V (объем титранта).

До проведения измерений потенциометр калибруют с применением используемой пары электродов (измерительного и сравнения) с помощью растворов, содержащих потенциалопределяющий ион в нескольких точных известных концентрациях.

По сравнению с классическим титриметрическим анализом потенциометрическое титрование дает большую точность, позволяет проводить титрование окрашенных, непрозрачных растворов или титрование при отсутствии подходящих индикаторов, а также за один прием определять концентрации нескольких веществ.

В исследовании пищевых рыбных продуктов потенциометрия применяется для определения pH, буферности, общей кислотности, перекисного и кислотного чисел, содержания аминного азота.

Контрольные вопросы

1. Какие электроды используются в рассматриваемом методе?
2. Чем отличается функция измерительного электрода от функции электрода сравнения?
3. Что такое буферность пресервов? Что отражает данный показатель?
4. Почему в качестве опорных значений pH при определении буферности пресервов приняты 8,2 и 9,8?
5. Какие индикаторы используются в случае определения буферности пресервов классическим титриметрическим методом?
6. Что такое общая кислотность продукта?
7. В чем измеряется кислотность испытанных продуктов? Каков диапазон измерений кислотности с помощью рассматриваемого метода?
8. В какой области pH и почему находится точка эквивалентности, устанавливаемая при определении кислотности рыбных консервов?
9. Какой индикатор может использоваться в случае определения кислотности заданного продукта классическим титриметрическим методом?
10. Каковы приписанные метрологические характеристики рассматриваемых методик?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8
ИЗУЧЕНИЕ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ

Цель лабораторной работы: формирование знаний в области газохроматографического анализа.

Задание: изучить стандартизированную методику определения содержания полихлорированных бифенилов по ГОСТ 31792.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

Задание различается изучаемыми способами детектирования разделенных бифенилов.

Теоретическая часть.

Хроматография – физико-химический метод анализа и исследования веществ и их смесей, основанный на разделении компонентов за счет распределения их при перемещении сквозь слой неподвижной фазы потоком подвижной фазы.

Теоретический базис метода составляет принцип разделения – неодинаковое сродство веществ к летучей подвижной фазе и неподвижной фазе (НЖФ) в колонке. Кроме того, в основе хроматографических процессов лежат явления сорбции и десорбции, многократное повторение актов которых в совокупности с различиями между константами распределения отдельных компонентов пробы между перемещающимися относительно друг друга фазами приводит к желаемому разделению компонентов пробы.

Газовая хроматография – хроматография, в которой подвижная фаза находится в состоянии газа или пара – инертный газ (газ-носитель). НЖФ является высокомолекулярная жидкость, закрепленная на пористом носителе или на стенках длинной капиллярной трубки (хроматографической колонки). Компоненты пробы (разделяемой смеси) перемещаются по хроматографической колонке с потоком газа-носителя. По мере движения разделяемая смесь многократно распределяется между газом-носителем и нелетучей НЖФ, нанесенной на инертный материал (твердый носитель), которым заполнена колонка. Компоненты смеси селективно задерживаются НЖФ, поскольку растворимость их в этой фазе различна, и таким образом разделяются – компонентам с большей сорбционной способностью требуется большее время для выхода из жидкой фазы, чем компонентам с меньшей сорбционной способностью. Затем вещества выходят из колонки и регистрируются детектором, сигнал которого регистрируется в виде хроматограммы компьютером. С помощью программного обеспечения, имеющего алгоритм распознавания, и сформированных банков данных можно решать задачи расшифровки хроматограмм и количественного определения компонентов.

Основными компонентами газового хроматографа (рис. 6) являются источник газа-носителя, регулятор потока газов, устройство ввода пробы (инжектор), хроматографическая колонка, термостат, детектор и регистратор сигнала (система сбора данных).

Регулятор потока обеспечивает очистку, подачу и стабилизацию скорости и расхода газа-носителя в колонку, а также других газов, необходимых для работы детектора. Инжектор в виде устройства с самоуплотняющейся резиновой мембраной или крана-дозатора позволяет вводить в поток газа-носителя определенное количество анализируемой пробы в газообразном или жидком состоянии. Устройство ввода пробы необходимо термостатировать при температуре, равной температуре колонки или выше на 20–30 °С. Термостат служит для установки и поддерживания рабочих температур колонок (до 350 °С), инжекто-

ра, детектора и других узлов хроматографа. Детектор преобразует соответствующие изменения физических или физико-химических свойств бинарных смесей (компонент пробы – газ-носитель по сравнению с чистым газом носителем) в электрический сигнал. Величина сигнала зависит как от природы компонента, так и от содержания его в анализируемой смеси. Система сбора данных преобразует изменения физико-химических параметров в электрический сигнал, величина и форма которого регистрируются на компьютере.

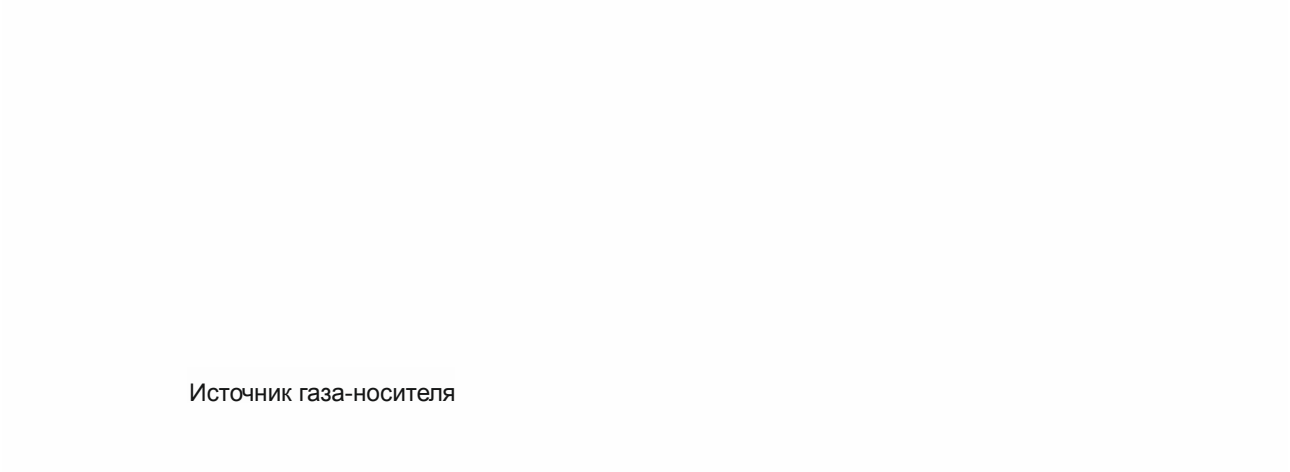

Рисунок 6. Схема газового хроматографа

Хроматографическая колонка представляет собой трубку с фиксированной НЖФ, через которую протекает газ-носитель. В настоящее время наибольшее распространение получили капиллярные колонки с внутренним диаметром 0,05 – 0,5 мм, длиной 10 – 200 м и объемом 0,02 – 39,2 $см^3$.

Пара «газ-носитель – НЖФ» зависят от характера определяемых в пробе компонентов. В качестве газов-носителей могут использоваться аргон, азот, гелий, водород, в качестве вспомогательных газов (для обеспечения функционирования детекторов) – кислород, воздух, углекислый газ. В качестве неподвижных фаз используются органические и кремнийорганические соединения, различающиеся по виду функциональных групп – неполярные насыщенные, полярные с локально концентрированными отрицательными зарядами и полярные с локально концентрированными положительными и отрицательными зарядами.

В исследованиях пищевых продуктов применяются детекторы электронного захвата (ДЭЗ), пламенно-ионизационный (ПИД) и масс-спектрометрический (МСД).

Действие ДЭЗ основано на изменении типа ионной рекомбинации газа-носителя. Сигналом детектора является снижение силы тока при поступлении в детектор анализируемого вещества. В ионизационной ячейке газ-носитель под воздействием β-излучения источника детектора ионизируется с образованием положительных ионов и свободных электронов. Условия электронного питания обеспечивают частичную обратимость процесса ионизации за счет протекания ион-электронной рекомбинации. Молекулы анализируемого вещества, облада-

ющего сродством к электрону, при появлении в детекторе захватывают свободные электроны, образуя массивные отрицательные ионы, подвижность которых на 4–5 порядков меньше подвижности свободных электронов, что приводит к замене электрон-ионной рекомбинации на ион-ионную.

Действие ПИД основано на зависимости электрической проводимости ионизированного газа от его состава. Сигналом детектора является изменение ионного тока, вызванное введением в детектор анализируемого вещества. Газноситель в смеси с анализируемой смесью и водородом подается в форсунку горелки, где происходит ионизация. Одновременно горелка выполняет функцию одного из электродов, а свернутая в цилиндр нержавеющая пластинка, укрепленная на небольшом расстоянии над пламенем, образует второй – собирающий электрод.

Действие МСД основано на разделении ионизированных частиц по отношению их массы к величине заряда. Сигналом детектора является возникающий на коллекторе ток, пропорциональный относительному количеству ионов с соответствующей массой. При бомбардировке электронами молекул в газообразном состоянии связи в молекулах разрываются и образуют ионы, вид и количество которых характерны для конкретной молекулы. При некотором постоянном магнитном поле в детекторе поток ионов, содержащий ионы с идентичным значением масса/заряд, попадает на коллектор. Изменением магнитного поля постепенно переводят на коллектор потоки ионов с другим соотношением масса/заряд. Ток коллектора записывается и дает масс-спектрограмму.

Результат хроматографического анализа графически отображается в виде хроматограммы (рис. 7).

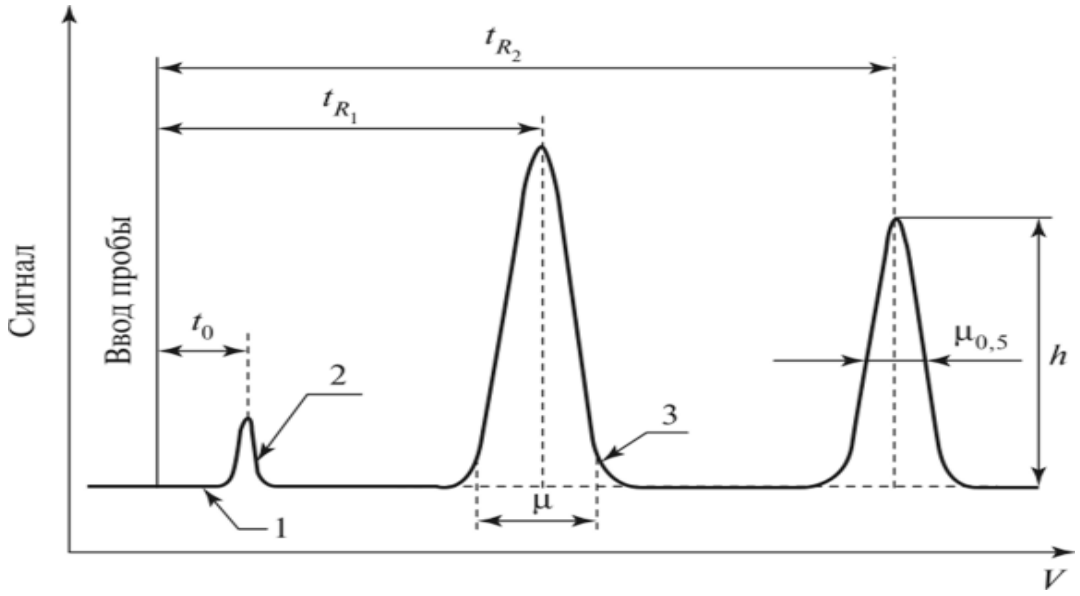

Рисунок 7. Хроматографические параметры:
1 – нулевая линия, 2 – пик несорбирующегося вещества, 3 – пик определяемого компонента, h – высота пика, t_0 – «мертвое» время колонки, t_R – время удерживания определяемых компонентов, μ – ширина пика, $\mu_{0,5}$ – полуширина пика

Для определения неизвестной концентрации определяемого компонента в пробе вещества при помощи газовой хроматографии предварительно строят калибровочную зависимость, для чего хроматографируют несколько эталонных растворов определяемого компонента различных известных концентраций.

Нижний предел определения концентраций веществ зависит от вида элюента, вида хроматографической колонки, типа детектора, параметров разделения и детектирования и составляет от 10^{-6} % для ПИД и $5 \cdot 10^{-9}$ % для ДЭЗ.

В исследовании пищевых рыбных продуктов газовая хроматография применяется для определения жирнокислотного состава, содержания антиокислителей, остатков гормональных лекарственных средств, летучих углеводородов, пестицидов, полихлорированных бифенилов и диоксинов.

Контрольные вопросы

1. Для чего в изученной методике используется безводный сернокислый натрий?
2. Что используется в качестве неподвижной и подвижной фаз?
3. Какие параметры хроматографирования являются критичными для получения технически корректных результатов?
4. Какой детектор используется в изучаемой методике? В чем его принцип действия?
5. Что такое нулевая линия хроматограммы?
6. Что такое хроматографический шум?
7. Что такое дрейф нулевой линии?
8. Что такое хроматографический пик?
9. В каком порядке будут выходить бифенилы на масс-спектрограмме?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Цель лабораторной работы: формирование знаний и навыков в области тонкослойной хроматографии.

Задание: освоить стандартизированную методику определения содержания синтетических красителей в пряностях по ГОСТ 31701.

Аппаратура, материалы и реактивы – согласно используемой стандартизированной методике.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

Работа выполняется группами по 2–3 человека. Задание различается видом смеси анализируемых специй. Работа выполнятся в последовательности, определяемой используемой стандартизированной методикой испытаний.

Полученный результат исследований сравнивается со значением, преду-

смотренным ТР ТС 029/2012. Делается вывод о степени соответствия образца установленным требованиям.

Теоретическая часть.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) – вид хроматографического анализа, процессы разделения в котором протекают в двухмерном пространстве, поскольку неподвижная фаза нанесена на плоский носитель.

Теоретическим базисом метода является соотношение коэффициентов распределения компонентов пробы в двух фазах хроматографической системы. Основная качественная характеристика ТСХ – фактор удерживания (R_f), представляющий собой отношение расстояний, пройденных исследуемым компонентом (l) и элюентом (L) (см. рис. 8):

$$R_f = \frac{l}{L} . \quad (9)$$

Эффективность хроматографического разделения характеризуют числом (N) и высотой (H) эквивалентных теоретических тарелок:

$$N = 16\left(\frac{l_0}{a}\right)^2 , \quad (10)$$

$$H = \frac{a^2}{16 l_0} , \quad (11)$$

где a – ширина зоны компонента, l_0 – расстояние от стартовой линии до нижнего края зоны компонента.

В отличие от колоночной хроматографии (например, газовой) ТСХ – открытая система. Основные стадии – нанесение пробы, элюирование и оценка результатов, а также дополнительные этапы (получение производных разделяемых или разделенных компонентов пробы) выполняются независимо по времени и месту. Другим отличием от колоночных методов является параллельный анализ проб и стандартов, что обеспечивает экспрессность, и экономичность в расчете на одну пробу. Еще одним отличием является то, что исследователь может «видеть» всю хроматограмму, так как все фракции остаются на хроматографической пластине от старта до фронта. Преимущество ТСХ заключается в возможности минимизации пробоподготовки, поскольку «очистка» пробы происходит в самом процессе разделения.

Пробу наносят на край хроматографической пластины (стартовая линия). Выбор техники нанесения зависит от требуемых точности, объема пробы, количества проб и т. д. После подсушивания слоя край пластинки ниже стартовой линии погружают в хроматографическую камеру с элюентом, который под действием капиллярных сил передвигается вверх. Вместе с элюентом передвигаются с различными скоростями растворимые в нем компоненты пробы. По завершении процесса отмечают линию фронта элюента и визуально (как правило, с помощью реакции окрашивания) обнаруживают зоны каждого из компонентов и измеряют расстояние от стартовой линии до центров таких зон, которое является мерой линейной скорости движения отдельного компонента.

Как правило, в современном анализе используют коммерчески доступные

готовые пластинки с нанесенным слоем сорбента. Хроматографические камеры представляют собой прямоугольные стеклянные лотки, соответствующие размерам хроматографических пластинок. Применяемые сорбенты могут быть полярными (например, силикагель, оксид алюминия), адсорбция на которых обусловлена ион-дипольными и диполь-дипольным взаимодействиями, и неполярными (например, активированный древесный уголь), адсорбция на которых протекает под действием ван-дер-ваальсовых сил. Подбор элюента обусловлен избирательной растворимостью отдельных компонентов пробы. В качестве проявителей зон разделенных компонентов могут выступать дающие окрашенные или флуоресцирующие соединения реагенты – например, аммиак, бром, йод.

Пример планарной хроматограммы представлен на рис. 8.

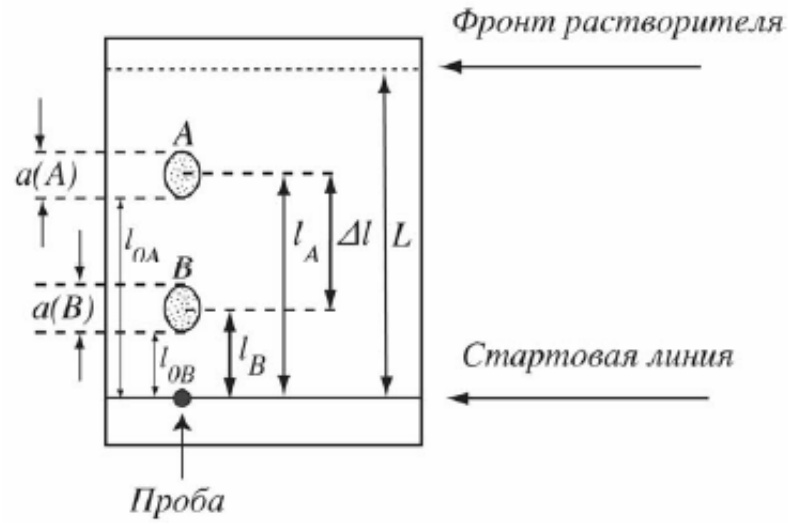

Рис. 8. Параметры планарной хроматограммы:
A, B – разделенные компоненты пробы, a – ширина зоны компонента,
l_0 – расстояние от стартовой линии до нижнего края зоны компонента,
l – расстояние, пройденное компонентом пробы, L – расстояние, пройденное элюентом, Δl – расстояние между разделенными компонентами

Количественное определение содержание конкретного компонента в пробе определяют через площадь зоны такого компонента, с помощью снятия вещества с хроматографической пластинки и его дальнейшего количественного определения или с помощью денситометра – прибора, регистрирующего спектр поглощения, отражения или излучения (флуоресценции) зоны вещества.

Для более надежной идентификации разделяемых компонентов применяют «свидетели» – растворы стандартных веществ, наличие которых определяется в анализируемой пробе. Стандартное вещество наносят на стартовую линию рядом с анализируемой пробой и хроматографируют в одних условиях.

Калибровка, используемая для количественного определения, представляет собой нанесение нескольких концентраций стандартных веществ для по-

строения зависимости площади зоны вещества от концентрации или расчета денситометрических зависимостей.

В исследовании пищевых рыбных продуктов тонкослойная хроматография применяется для определения содержания красителей и пестицидов.

Контрольные вопросы

1. Для чего используется в освоенной методике этанол?
2. Какова последовательность операций с патронами для твердофазной экстракции?
3. Что используется в качестве элюентов?
4. Что используется в качестве контрольных образцов? Какова их роль?
5. Что такое линия старта? Каковы особенности ее расположения?
6. Что такое фактор удерживания?
7. Что такое параметр разрешающей способности?
8. По каким характеристикам проводят качественную идентификацию синтетических красителей?
9. На чем основано количественное определение синтетических красителей в изученной методике?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10
ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КРАСИТЕЛЕЙ

Цель лабораторной работы: формирование знаний в области иммуноферментного анализа.

Задание: изучить стандартизированную методику определения содержания остаточного содержания трифенилметановых красителей по ГОСТ Р 57025.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

Задание различается изучаемыми тест-системами.

Теоретическая часть.

Иммуноферментный анализ – биохимический метод анализа, основанный на специфическом связывании определяемого компонента пробы соответствующими антителами и индикации образующегося комплекса антиген-антитело с помощью ферментных меток.

Теоретический базис метода составляет антигенная специфичность, причиной которой является наличие антигенных детерминант – эпитопов (последовательность и пространственное расположение функциональных групп) на поверхности антигенов, связываясь с которыми антитела способны образовывать комплементарные иммунные комплексы с соответствующими антигенами. Процесс образования иммунных комплексов происходит в строго количественном соотношении, обусловленном равновесной константой образования (афин-

ностью), концентрациями компонентов и условиями реакции, что позволяет для определения исходной концентрации анализируемого соединения использовать количественную оценку образовавшихся иммунных комплексов, либо определение количества оставшихся свободными мест специфического связывания.

Антитела представляют собой специфические белки крови (иммуноглобулины), вырабатываемые иммунной системой для удаления из организма попавших в него чужеродных веществ. Антигены – вещества, способные вызывать подобный иммунный ответ: белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты как в очищенном виде, так и в виде компонентов различных биологических структур (вирусов, клеток и т. д.).

Первичным процессом в иммуноферментном анализе является стадия «узнавания» анализируемого соединения специфическим к нему антителом. Второй общей стадией ИФА является формирование связи меченного ферментом соединения со специфическим комплексом или свободными центрами связывания. Заключительным обязательным процессом ИФА является преобразование ферментной метки в соответствующий сигнал, измеряемый каким-либо физико-химическим методом (спектрофотометрическим, флуориметрическим, электрохимическим и т. д.), что достигается посредством измерения скорости превращения субстрата или количества продукта, образующегося за фиксированный промежуток времени.

В зависимости от типа реагентов, используемых на первой стадии анализа, методы ИФА подразделяют на неконкурентные – когда в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), и конкурентные – когда в системе одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за имеющиеся в относительном недостатке центры специфического связывания.

По типу проводимых на каждой стадии реакций методы ИФА разделяют на гомогенные – осуществляемые в однофазной системе и не требующие стадии механического разделения образовавшихся комплексов, и гетерогенные – в которых анализ проводится в двухфазной системе, при этом разделение на фазы может происходить на любой стадии определения.

Чувствительность метода зависит от времени ферментативной реакции, метода детектирования и составляет от 10^{-12} М.

В исследовании пищевых рыбных продуктов иммуноферментный анализ применяется для определения содержания гистамина, красителей и ветеринарных препаратов.

Контрольные вопросы

1. Какие способы пробоподготовки используются в изученной методике?

2. Какие взаимодействия протекают при внесении в лунки планшета рабочих градуированных растворов, антител и экстрактов испытуемых проб?

3. Какие взаимодействия протекают при внесении в лунки планшета раствора ферментного конъюгата?

4. Какова функция субстрата и хромогена?

5. Какова функция стоп-реагента? Какое соединение используется в этом качестве?

6. Какой прибор используется для количественного определения результатов?

7. Каковы пределы обнаружения красителей в изученной методике?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11
ИЗУЧЕНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель лабораторной работы: формирование знаний в области анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Задание: изучить общие требования к определению патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах методом ПЦР по ГОСТ ISO 22119.

Методические указания по выполнению лабораторной работы

См. общие положения к лабораторному практикуму.

Теоретическая часть.

Полимеразная цепная реакция – метод молекулярной биологии, позволяющий добиться увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты в пробе.

Теоретический базис метода составляет комплементарность используемых при амплификации праймеров специфичным участкам нуклеиновой кислоты конкретного организма.

ПЦР представляет собой многократное ферментно-опосредованное умножение (амплификацию) заданного участка нуклеиновой кислоты, границы которого соответствуют коротким олигонуклеотидным последовательностям (праймерам) – т. е. ПЦР является циклическим синтезом *in vitro* выбранного фрагмента нуклеиновой кислоты. Специфичность реакции обеспечивается правильным выбором праймеров. Наличие искомого фрагмента по окончании реакции чаще всего определяют с помощью электрофоретического разделения или флуорометрии в режиме реального времени.

ПЦР осуществляют в буферно-солевом растворе, содержащем ионы магния, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты и термостабильную Taq-полимеразу. Реакция инициируется парой праймеров, каждый из которых комплементарен различным участкам амплифицируемой нуклеиновой кислоты. Первым этапом цикла реакции является денатурация нуклеиновой кислоты материала пробы при 94–96 °С с образованием двух одноцепочечных молекул. На втором этапе при 45–65 °С происходит гибридизация (отжиг) праймеров и одноцепочечной матрицы нуклеиновой кислоты, в процессе которой праймеры распознают комплементарные им участки матричной нуклеиновой кислоты. На третьем этапе

при 65–72 °С в течение определенного времени осуществляется репликация одноцепочечных нуклеиновых кислот, которые, в свою очередь, становятся матрицами для синтеза своих новых копий.

Осуществляется ПЦР в автоматическом режиме на приборах, контролирующих задаваемые параметры реакции – температуру, длительность отдельных этапов цикла, число циклов и т. д. Продолжительность цикла составляет до 5 мин, реакция состоит, как правило, из 25 – 40 циклов.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводят в агарозном или полиакриламидном гелях, для визуализации нуклеиновых кислот используя окрашивание бромистым этидием, нитратом серебра или мечение флюорохромами.

Флуоресцентное качественное и количественное определение продуктов амплификации осуществляют посредством измерения флуоресцентного сигнала в каждом цикле амплификации. Флуоресценция обеспечивается за счет связывания флуоресцентного красителя с синтезируемой двухцепочечной нуклеиновой кислотой или благодаря ДНК-зонду, расщепляемому на флуоресцентную метку и гаситель за счет 5'-экзонуклеазной активности при синтезе комплементарной цепи ДНК.

Для оценки эффективности амплификации используют положительные и отрицательные стандартные и/или контрольные образцы. Ошибки в виде ложноположительных и ложноотрицательных результатов могут быть вызваны неправильными отбором, хранением и транспортировкой проб, а также некорректным выбором системы пробоподготовки, контаминацией пробы в ходе анализа и некорректной интерпретацией результатов ПЦР-анализа.

Эффективность ПЦР зависит от типа используемого амплификатора, типа используемой ДНК-полимеразы, состава буферного раствора, объема реакционной смеси, длины и первичной структуры праймеров, выбранной специфической последовательности нуклеиновой кислоты.

Контрольные вопросы

1. Какие последовательно выполняемые этапы включает в себя изучаемый метод анализа?

2. Что такое нуклеиновые кислоты? Из каких мономеров они состоят?

3. Каков принцип действия гидролизуемого зонда?

4. Каков принцип действия зондов гибридизации?

5. Каков принцип действия молекулярного маяка?

6. Какие способы лежат в основе обнаружения и идентификации ПЦР-продуктов?

7. В чем заключается метод стандартной кривой при количественном определении продуктов ПЦР?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, В. Н. Количественный анализ / В. Н. Алексеев / Под ред. П. К. Агасяна. – Москва: Химия, 1972. – 504 с.
2. Высокоэффективная тонкослойная хроматография / Под ред. А. Златкиса, Р. Кайзера. – Москва: Мир, 1979. – 245 с.
3. Герасимова, Н. С. Гравиметрический анализ: методические указания к выполнению домашних заданий по аналитической химии / Н. С. Герасимова, Ю. С. Логинова / Под ред. И. В. Федосеева. – Москва: Изд-во МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2012. – 48 с.
4. ГОСТ 7636-85 Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа.
5. ГОСТ 19182-2014 Пресервы из рыбы. Методы определения буферности.
6. ГОСТ 26829-86 Консервы и пресервы из рыбы. Методы определения жира.
7. ГОСТ 26927 Сырье и продукты пищевые. Метод определения ртути.
8. ГОСТ 27082-2014 Консервы и пресервы из рыбы, водных беспозвоночных, водных млекопитающих и водорослей. Методы определения общей кислотности.
9. ГОСТ 30178-96 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов.
10. ГОСТ 31701-2012 Продукты пищевые. Метод определения наличия синтетических красителей в пряностях.
11. ГОСТ 31707-2012 Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение общего мышьяка и селена методом атомно-абсорбционной спектрометрии с генерацией гидридов с предварительной минерализацией пробы под давлением.
12. ГОСТ 31792-2012 Рыба, морские позвоночные и продукты их переработки. Определение содержания диоксинов и диоксинподобных полихлорированных бифенилов хромато-масс-спектральным методом.
13. ГОСТ 32161-2013 Продукты пищевые. Метод определения содержания цезия Cs-137.
14. ГОСТ 32163-2013 Продукты пищевые. Метод определения содержания стронция Sr-90.
15. ГОСТ Р 54058-2010 Продукты пищевые специализированные и функциональные. Метод определения каротиноидов.
16. ГОСТ Р 57025-2016 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Иммуноферментный метод определения остаточного содержания трифенилметановых красителей.
17. ГОСТ ISO 22119-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени для определения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Общие требования и определения.

18. Коренман, Я. И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов: в 4-х кн. / Я. И. Коренман. – Москва: КолосС, 2005. – Кн. 2: Оптические методы анализа. – 288 с.

19. Коренман, Я. И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов: в 4-х кн. / Я. И. Коренман. – Москва: КолосС, 2005. – Кн. 3: Электрохимические методы анализа. – 232 с.

20. МР 2.3.1.1915-04 Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ.

21. Основы полимеразной цепной реакции / Сост. В. В. Зорина. – Москва: ДНК-Технологии, 2012. – 76 с.

22. Практикум по ядерной физике / Под ред. В. О. Сергеева. – Санкт-Петербург: Изд-во СПбГУ, 2006. – 184 с.

23. Пупышев, А. А. Атомно-абсорбционный спектральный анализ / А. А. Пупышев. – Москва: Техносфера, 2009. – 784 с.

24. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев, Е. М. Гаврилова. – Москва: Высш. шк., 1991. – 288 с.

25. ТР ЕАЭС 040/2016 Технический регламент Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и рыбной продукции».

26. ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции».

27. ТР ТС 029/2012 Технический регламент Таможенного союза «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств».

28. Царев, Н. И. Практическая газовая хроматография / Н. И. Царев, В. И. Царев, И. Б. Катраков. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2000. – 156 с.

Учебное издание

Соклаков Владимир Владимирович
Рачкова Наталья Анатольевна

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ
Часть 1
ТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ИЗ ВОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ

Редактор Г. А. Смирнова

Подписано в печать 29.01.2021 г. Формат 60 × 90 1/16. Уч.-изд. л. 2,8.
Печ. л. 2,1. Тираж 20 экз. Заказ № 7

Издательство федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Калининградский государственный технический университет».
236022, Калининград, Советский проспект, 1