

**Войціцький В.М., Корнієнко В.І., Хижняк С.В., Самкова О.П.,
Вишнівський П.С., Альтанова А.Б.**

**АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ СИРОВИНИ І
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ**

**(СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНІ, ХРОМАТОГРАФІЧНІ,
ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ, ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ, ІМУНОЛОГІЧНІ)**

ПОСІБНИК

КИЇВ - 2024

УДК 577.1:547.42;167.2:243.544:543.545.2;167.2:577.21:604.6;
543.554:637.05

Рекомендовано для видання рішенням Вченої ради Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України (протокол № 5 від 13.06.2024).

Рецензенти:

Калачнюк Л.Г., доктор біологічних наук, професор, професор кафедри біохімії і фізіології ім. акад. М.Ф. Гулого факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України;

Григор'єва Л.І., доктор біологічних наук, професор, завідувачка кафедри екології Чорноморського національного університету імені Петра Могили.

Посібник. Аналітичні методи досліджень сировини і харчових продуктів (спектрофотометричні, хроматографічні, електрохімічні, електрофоретичні, імунологічні): посібник (В.М. Войціцький, В.І. Корнієнко, С.В. Хижняк, О.П. Самкова, П.С. Вишнівський, А.Б.Альтанова– Київ: Видавництво «Наукова столиця», 2024. - 260 с.

ISBN

Посібник є частиною навчального комплексу «Сучасні методи досліджень сировини і харчових продуктів». В ньому викладені у вигляді лабораторних робіт аналітичні спектрофотометричні, хроматографічні, електрохімічні, електрофоретичні та імунологічні методи визначення біологічно активних речовин (білків, ліпідів, вуглеводів, вітамінів), оцінки характеристик сировини і харчових продуктів (кислотності, окиснюваності тощо), залишкових кількостей хімічних забруднювачів (нітратів, нітритів, пестицидів, поліциклічних ароматичних вуглеводів, поліхлорованих біфенілів, мікотоксинів, важких металів) та харчових добавок. Також наведені лабораторні роботи з ідентифікації та кількісного визначення генетично модифікованих організмів. Всі методики викладені згідно діючих ДСТУ.

Посібник призначено для студентів, аспірантів, молодих спеціалістів, які вивчають або вже працюють в галузі безпеки харчових продуктів і питної води.

ISBN

© Войціцький В.М., Корнієнко В.І., Хижняк С.В.,
Самкова О.П., Вишнівський П.С., Альтанова А.Б. 2024

©НУБіП України, 2024

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
1. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНІ МЕТОДИ.....	9
<i>Лабораторна робота 1.1.</i> Визначення вмісту протеїну в м'ясі та м'ясних продуктах спектрофотометричним методом.....	9
<i>Лабораторна робота 1.2.</i> Кількісне визначення альдегідів (бензидинового числа) у тваринних жирах і рослинних оліях спектрофотометричним методом.....	14
<i>Лабораторна робота 1.3.</i> Визначення анізидинового числа в тваринних жирах і рослинних оліях спектрофотометричним методом.....	16
<i>Лабораторна робота 1.4.</i> Визначення вмісту каротинів рослин спектрофотометричним методом.....	18
<i>Лабораторна робота 1.5.</i> Кількісне визначення ретинолу (вітаміну А) в тваринних продуктах спектрофотометричним методом.....	20
<i>Лабораторна робота 1.6.</i> Кількісне визначення токоферолів (вітаміну Е) в тваринних продуктах спектрофотометричним методом..	22
<i>Лабораторна робота 1.7.</i> Кількісне визначення тіаміну (вітаміну В ₁) в тваринних продуктах спектрофотометричним методом	25
<i>Лабораторна робота 1.8.</i> Кількісне визначення рибофлавіну (вітаміну В ₂) в ікрі риб спектрофлуориметричним методом	28
<i>Лабораторна робота 1.9.</i> Визначення вмісту нітратів і нітритів спектрофотометричним методом	31
<i>Лабораторна робота 1.10.</i> Кількісне визначення нітритів у м'ясних продуктах спектрофотометричним методом.....	38
<i>Лабораторна робота 1.11.</i> Визначення вмісту сахарози в цукрі поляриметричним методом.....	41
<i>Лабораторна робота 1.12.</i> Визначення вмісту розчинних сухих речовин за сахарозою в продукції цукрового виробництва рефрактометричним методом.....	46
<i>Лабораторна робота 1.13.</i> Визначення бензо(а)пірену у продуктах харчування методом спектрофлуориметрії за низької температури.....	50
<i>Лабораторна робота 1.14.</i> Визначення бензо(а)пірену у продуктах харчування методом спектрофлуориметрії за кімнатної температури.....	59
<i>Лабораторна робота 1.15.</i> Визначення Плюмбуму, Купруму і Цинку	

за характерними для кожного хімічного елемента реакціями.....	
<i>Лабораторна робота 1.16.</i> Кількісне визначення Феруму спектрофотометричним методом з використанням калію роданіду (калію тіаціанату).....	68 76
<i>Лабораторна робота 1.17.</i> Кількісне визначення Купруму спектрофотометричним методом з використанням диетилтіофосфатів.....	78
<i>Лабораторна робота 1.18.</i> Кількісне визначення Цинку спектрофотометричним методом з використанням дитизону (дифенілтіокарбазону).....	80
<i>Лабораторна робота 1.19.</i> Кількісне визначення Мангану спектрофотометричним методом з використанням амонію персульфату.....	84
<i>Лабораторна робота 1.20.</i> Визначення вмісту важких металів (Кадмію, Купруму, Плюмбуму, Феруму і Цинку) в харчових продуктах методом атомно-абсорбційної спектрометрії	87
<i>Лабораторна робота 1.21.</i> Визначення вмісту Арсену в харчових продуктах методом атомно-абсорбційної спектрометрії.....	92
<i>Лабораторна робота 1.22.</i> Визначення вмісту розчинених у воді хімічних елементів методом атомно-емісійної спектрометрії з індуктивно-зв'язаною плазмою.....	99
2. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ.....	106
<i>Лабораторна робота 2.1.</i> Ідентифікація та визначення жирнокислотного складу тваринних жирів і рослинних олій методом газової хроматографії.....	107
<i>Лабораторна робота 2.2.</i> Визначення вмісту ретинолу (вітаміну А) в тваринних продуктах методом високоефективної рідинної хроматографії.....	113
<i>Лабораторна робота 2.3.</i> Ідентифікація та визначення вмісту афлатоксинів В ₁ , В ₂ , G ₁ і G ₂ у зерні методом двомірної тонкошарової хроматографії.....	117
<i>Лабораторна робота 2.4.</i> Ідентифікація та визначення афлатоксинів В ₁ , В ₂ , G ₁ і G ₂ у зерні методом високоефективної рідинної хроматографії.....	118
<i>Лабораторна робота 2.5.</i> Ідентифікація та визначення афлатоксину М ₁ у молоці методом високоефективної рідинної	

хроматографії.....	125
<i>Лабораторна робота 2.6.</i> Ідентифікація та визначення охратоксину А у зерні методом високоефективної рідинної хроматографії.....	130
<i>Лабораторна робота 2.7.</i> Ідентифікація та визначення мікотоксину патуліну в харчових продуктах методом високоефективної рідинної хроматографії.....	134
<i>Лабораторна робота 2.8.</i> Визначення вмісту афлатоксину В1 та суми афлатоксинів В1, В2 , G1 та G2 у зерні, фруктах та продуктах з них методом високоефективної рідинної хроматографії.....	140
<i>Лабораторна робота 2.9.</i> Визначення вмісту мікотоксину зеараленону в кормах методом високоефективної рідинної хроматографії	146
<i>Лабораторна робота 2.10.</i> Ідентифікація та визначення вмісту залишків піретроїдів у харчових продуктах методом газової хроматографії.....	152
<i>Лабораторна робота 2.11.</i> Визначення вмісту залишків пестициду дихлордифенілтрихлорметилметан (ДДТ) у борошні методом газової хроматографії.....	156
<i>Лабораторна робота 2.12.</i> Визначення вмісту бензойної та сорбінової кислот у харчових продуктах методом високоефективної рідинної хроматографії.....	159
<i>Лабораторна робота 2.13.</i> Визначення вмісту поліхлорованих біфенілів у воді методом газової хроматографії.....	163
<i>Лабораторна робота 2.14.</i> Визначення вмісту поліхлорованих біфенілів у жирних харчових продуктах методом газової хроматографії.....	168
3. ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ МЕТОДИ.....	183
<i>Лабораторна робота 3.1.</i> Визначення вмісту іонів Купруму потенціометричним методом за допомогою купрум-селективного електроду.....	184
<i>Лабораторна робота 3.2.</i> Визначення вмісту небілкового і білкового Нітрогену в комбікормах та сировині методом потенціометричного титрування.....	187
<i>Лабораторна робота 3.3.</i> Визначення вмісту білку у м'ясі та м'ясних продуктах методом К'єндаля.....	189
<i>Лабораторна робота 3.4.</i> Визначення окиснюваності м'яса і м'ясних продуктів біхроматним методом.....	196

<i>Лабораторна робота 3.5.</i> Визначення кислотності молока та молочних продуктів методом потенціометричного титрування.....	199
<i>Лабораторна робота 3.6.</i> Визначення кислотності молока та молочних продуктів методом титрування з використанням індикатору фенолфталеїну.....	202
<i>Лабораторна робота 3.7.</i> Визначення пероксидного числа тваринних жирів та рослинних олій.....	209
<i>Лабораторна робота 3.8.</i> Визначення кислотного числа рослинних олій.....	213
4. ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ МЕТОДИ.....	219
<i>Лабораторна робота 4.1.</i> Визначення вмісту рослинного (соєвого) білка в м'ясних продуктах методом електрофорезу.....	220
<i>Лабораторна робота 4.2.</i> Визначення вмісту амінокислот (лізину, метіоніну, цистину і аргініну) в комбікормах і кормовій сировині методом капілярного електрофорезу.....	228
<i>Лабораторна робота 4.3.</i> Визначення вмісту водорозчинних вітамінів В ₁ (тіамінхлориду), В ₃ (пантотенової кислоти), В ₆ (піридоксину), В _с (фолієвої кислоти) і С (аскорбінової кислоти) у преміксах методом капілярного електрофорезу.....	235
<i>Лабораторна робота 4.4</i> Визначення вмісту синтетичних барвників у вині та виноматеріалах методом капілярного електрофорезу.....	243
<i>Лабораторна робота 4.5.</i> Визначення вмісту катіонів у воді методом капілярного електрофорезу.....	248
5. ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ОРГАНІЗМІВ.....	255
<i>Лабораторна робота 5.1.</i> Виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) з рослинної сировини.....	256
<i>Лабораторна робота 5.2.</i> Проведення якісного визначення ГМО методом ПЛР у реальному часі (скринінг регуляторів експресії).....	260
<i>Лабораторна робота 5.3.</i> Ідентифікація ГМ-лінії сої GTS40-3-2 методом ПЛР у реальному часі	266
<i>Лабораторна робота 5.4.</i> Проведення кількісного визначення ГМО методом ПЛР у реальному часі за допомогою ГМО-стандартів.....	271
ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА.....	274

ВСТУП

Провідне місце в житті людини займає безпека харчування і споживання питної води. Це неможливо без визначення харчової цінності продуктів та оцінки їх безпечності з точки зору наявності небезпечних (токсичних) речовин, що можливо внаслідок обробки сировини чи її зберіганні. Надзвичайну небезпеку становлять як хімічні природні і антропогенні забруднювачі, так і біологічні патогени.

Вирішення проблеми визначення хімічного складу сировини і харчових продуктів, ідентифікації та кількісної оцінки забруднювачів потребує підготовки відповідних працівників (експертів-аналітиків), а саме таких, які здатні науково обґрунтовано обрати необхідний аналітичний метод для вирішення поставлених задач. Головне – отримання з необхідною чутливістю і токсичністю вірогідних результатів та їх аналіз.

Дане навчально-практичне видання містить необхідну інформацію для володіння знаннями стосовно практичного застосування низки аналітичних методів із врахуванням сучасних вимог.

В одному виданні неможливо охопити всі нині існуючі аналітичні методи та висвітлити їхні можливості. В даному посібнику акцентується увага на найбільш застосованих у практиці методах (спектрофотометричних, хроматографічних, електрохімічних, електрофоретичних та імунологічних), які здатні забезпечити всебічну оцінку безпечності сировини і харчових продуктів і можуть бути впроваджені без особливої складності в аналітичних лабораторіях.

Даний посібник базується на матеріалах підручниках «Сучасні методи досліджень сировини і харчових продуктів. К.: РВВ НУБіП України, 2023. 548 с.» (автори: Л.В. Баль-Прилипко, В.І. Корнієнко, С.В. Хижняк, Ю.П. Крижова, М.С. Ніколаєнко, В.М. Войціцький, О.А. Андрощук), а наведені лабораторні роботи відповідають Державним стандартам України (ДСТУ).

При описі цих методів проведені певні узагальнення і систематизація відомостей. Наведені методики у своїй більшості апробовані і використовуються у практичній роботі в Українській лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України).

У навчальному посібнику розглянуто визначення в об'єктах дослідження вмісту білків, вуглеводів (цукрів), жирів, вітамінів, можливої наявності генетично модифікованих організмів (ГМО), а також окиснюваності та кислотності, продуктів пероксидного окиснення ліпідів (за показниками кислотного, пероксидного, бензидинового і анізидинового числа). Особлива увага приділена опису різних методичних підходів визначення як якісного складу, так і кількісного вмісту низки можливих забруднювачів сировини і продуктів харчування: нітратів і нітритів, певних пестицидів, важких металів, мікотоксинів, поліхлорованих біфенілів, поліциклічних ароматичних вуглеводів, харчових добавок (зокрема, бензойної та сорбінової кислот), ряду синтетичних барвників.

Лабораторні роботи в посібнику наведені згідно принципу, який застосовується при описі ДСТУ: назва роботи, принцип методу, матеріали для дослідження (об'єкти дослідження), устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали, хід роботи, проведення розрахунків.

У наведеному списку «Використаної літератури» представлені посилання на навчальну і наукову літературу, які сприяють покращенню засвоєння наведеного у цьому навчальному посібнику матеріалу.

Даний навчальний посібник за змістом, стилем надання матеріалу і формою його представлення орієнтований на студентів, аспірантів, молодих спеціалістів, які навчають або вже працюють в галузі безпеки харчових продуктів і питної води. Автори висловлюють щиру вдячність всім, хто сприяв виданню цього навчального посібника, висловив критичні зауваження і побажання для його покращення, які не залишилися поза увагою.

1. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНІ МЕТОДИ

До найбільш поширених фізико-хімічних методів контролю продуктів харчування людей, кормів для сільськогосподарських тварин і питної води відносяться фотометричні (грецьк. *photos* – світло та *metron* – міра, вимір) методи, а серед них – спектрофотометричні (лат. *spectrum*– видіння, видиме) методи. В їх основі – одержання і аналіз в ультрафіолетовій (УФ) області світла (довжина хвиль 10–380 нм), видимій світловій (380–750 нм) та інфрачервоної (ІЧ) області світла (від 750 нм до 1 мм) спектрів поглинання світла (адсорбційна спектрофотометрія) або спектрів випромінювання при збудженні її атомів (емісійна спектрофотометрія).

До спектрофотометричних методів також відносяться ті, яка базуються на законах відбиття, заломлення і розсіювання світла – поляриметрія та атомної (полум'яна) спектрометрія.

Крім самостійного використання в аналітичних дослідженнях, спектрофотометрія широко застосовується в поєднанні з іншими методами за використання детекторів (лат. *detector* – той, що виявляє, розкриває), тобто пристроїв для реєстрації спектрів.

Лабораторна робота 1.1. Визначення вмісту протеїну в м'ясі та м'ясних продуктах спектрофотометричним методом.

Принцип методу. Метод К'ельдаля, який базується на мінералізації проби і фотометричному вимірі екстинкції (оптичної густини) індофенолового синього, яка пропорційна кількості аміаку в мінералізаті.

Матеріали для дослідження: м'ясо, м'ясопродукти.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд, матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; терези аналітичні 2-го класу точності; витяжна шафа; м'ясорубка побутова або електром'ясорубка з отворами

решітки діаметром 3 мм; побутовий холодильник; скальпель, мішалка; вода дистильована; кислота сульфатна ($\rho_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1,84 \text{ г/см}^3$); хлорводнева кислота $0,1 \text{ моль/дм}^3$; амонію сульфат; натрію гідроксид; вапно хлорне; водню пероксид; фенол; натрій нітропрусидний; натрію тіосульфат; натрію гіпохлорит або натрію дихлоризоціанурат: калій йодистий; натрій вуглекислий безводний; амонію сульфат; промивалка; пробірки скляні місткістю 20 см^3 і штатив для них; колби конічні місткістю 25 і 50 см^3 ; колби мірні 100 , 250 і 1000 см^3 ; піпетки місткістю 1 і 5 см^3 ; воронки скляні; бюкси; колби К'ельдаля місткістю 750 см^3 ; стакани скляні місткістю 500 см^3 ; скляні банки місткістю 200 см^3 з кришками; фільтри паперові «синя стрічка» з усім необхідним для фільтрування.

Хід роботи:

Перед початком роботи готують ряд робочих розчинів:

1. Приготування реактиву 1. В мірну колбу місткістю 1 дм^3 поміщають 10 г фенола і $0,05 \text{ г}$ натрію нітропрусида, об'єм колби доводять до мітки дистильованою водою. Зберігають розчин не більше 2-х місяців.

2. Приготування реактиву 2. В мірну колбу місткістю 1000 см^3 поміщають 5 г натрію гідроксиду і його розчиняють в $40 - 50 \text{ см}^3$ дистильованої води. Після охолодження додатково додають $0,2 \text{ г}$ натрію дихлоризоціанурата або натрію гіпохлориту з розрахунку його вмісту $0,42 \text{ г/дм}^3$, доводять об'єм колби до мітки дистильованою водою. Зберігають реактив не більше 2-х місяців.

3. Приготування вихідного розчину натрію гіпохлориту. В перший скляний стакан місткістю 500 см^3 поміщають 150 г вапна хлорного і 250 см^3 дистильованої води, а в другому стакані в 250 см^3 дистильованої води розчиняють 105 г натрію вуглекислого. Ці розчини зливають при постійному перемішуванні. Отриману суспензію залишають на 1–2 доби для відстоювання. Потім рідину зливають і відфільтровують. Отриманий розчин може зберігатися в скляній посудині з темного скла до 1 року.

В отриманому розчині визначають концентрацію активного хлору. Для цього 1 см³ фільтрату розбавляють в колбі місткістю 100 см³ дистильованою водою до об'єму 40-50 см³, додають 2 г калію йодистого і 10 см³ хлорводневої кислоти 0,1 моль/дм³. Йод, який утворився, відтитровують 0,1 моль/дм³ розчином натрію сульфату, який готують з фіксаналу до зникнення вишневого забарвлення (1 см³ 0,1 моль/дм³ розчину натрію сульфату відповідає 0,00355 г хлору).

Визначення кількості натрію гіпохлориту у вихідному розчині. З урахуванням нестійкості розчину натрію гіпохлориту при зберіганні виникає необхідність визначення вмісту цього реактиву у вихідному розчині. Це робить по встановленню витраченого на титрування натрію тіосульфату. Наприклад, на титрування 1 см³ вихідного розчину натрію гіпохлориту витрачено 12,09 см³ 0,1 моль/дм³ натрію тіосульфату. Еквівалентна маса натрію гіпохлориту дорівнює половині молекулярної маси цього реактиву, а саме $74,4 : 2 = 37,2$ г. Таким чином, кількість натрію гіпохлориту у вихідному розчині складає $1,209 \cdot 37,2 = 44,97$ г.

Реактив 2 повинен містити 0,42 г натрію гіпохлориту, тоді з пропорції:

в 1000 см³ вихідного розчину – 44,97 г

X см³ – 0,42 г

знаходимо:

$$X = \frac{1000 \cdot 0,42}{44,97} = 9,4 \text{ см}^3.$$

Таким чином, для приготування 1 дм³ реактиву 2 необхідно 9,4 см³ вихідного розчину натрію гіпохлориту.

4. Приготування стандартного розчину амонію сульфату для побудови калібрувального графіка. Попередньо висушеного при температурі 60 °С до постійної маси 0,236 г амонію сульфату поміщають в мірну колбу місткістю 500 см³, розчиняють в 200-300 см³ дистильованої води

і доводять об'єм розчину до мітки цією водою. Отриманий розчин є стандартним і містить 0,1 мг азоту в 1 см³.

В подальшому у мірні колби місткістю 100 см³ вносять наступні кількості стандартного розчину амонію сульфату (в см³), відповідно: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 і 5,0. Після доведення об'єму колб до мітки дистильованою водою отримують серію робочих стандартних розчинів масової концентрації (в мкг азоту/см³): 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 і 5,0.

Для проведення кольорової реакції в пробірки додають по 1 см³ робочих стандартних розчинів, по 5 см³ реактиву 1 і 5 см³ реактиву 2 (див. вище), перемішують і через 30 хв. вимірюють величину екстинкції (оптичної густини) на спектрофотометрі при довжині хвилі 625 нм або фотоколориметрі з червоним світлофільтром в кюветі товщиною 1 см по відношенню до холостої проби (не містить стандартний розчин амонію сульфату). Повторюють виміри при температурі не нижче 20 °С три рази, кожний раз готують новий робочий стандартний розчин. З трьох вимірювань обчислюють середньоарифметичне значення, яке і використовують для побудови калібрувального графіку: по вісі абсцис відкладають значення величини концентрації азоту (мкг/см³), а вісі ординат – відповідну екстинкцію (оптичну густину).

При проведенні безпосереднього аналізу відібрані проби м'яса або м'ясних продуктів (200 – 400 г) двічі подрібнюють на побутовій або електричній м'ясорубці з отворами решітки діаметром 3 мм і ретельно перемішують. Підготовлену для аналізу пробу поміщають в склянку місткістю 200 см³, при цьому заповнюють її повністю і закривають кришкою. Пробу зберігають при температурі 3 – 5 °С до закінчення аналізу, але не довше однієї доби.

Наважку продукту розраховують наступним чином: частину подрібненої проби поміщають в бюкс, закривають кришкою і зважують з похибкою 0,0002 г. Потім з бюксу скальпелем відбирають 0,4 – 0,5 г продукту на листок

фільтру і разом з ним обережно вміщують в колбу К'ельдаля. Бюкс закривають, зважують і розраховують точну масу продукту, взятого для аналізу.

Такий же листок фільтру поміщають в контрольну колбу К'ельдаля. Потім в обидві колби додають 10 см³ концентрованої сульфатної кислоти, 1 – 2 г калію сульфату і проводять мінералізацію, при цьому періодично додають для прискорення процесу водню пероксид (5 – 7 см³) протягом усієї мінералізації.

Після мінералізації колби охолоджують і вміст переносять в мірні колби місткістю 250 см³, після охолодження об'єм колб доводять до мітки дистильованою водою і ретельно премішують.

В мірну колбу місткістю 100 см³ переносять 5 см³ первинно розведеного мінералізату і доводять до мітки дистильованою водою. Для проведення кольорової реакції 1 см³ вторинно розведеного мінералізату вносять в пробірку, а потім послідовно добавляють по 5 см³ реактиву 1 і реактиву 2 (див. вище) і ретельно перемішують. Через 30 хв визначають екстинкцію (оптичну густину) на спектрофотометрі при довжині хвилі 625 нм або на фотоколориметрі з червоним світлофільтром в кюветі товщиною 1 см по відношенню до контрольної проби, яку готують одночасно з використанням контрольного мінералізату. Температура реактивів при проведенні кольорової реакції повинна бути не нижче 20 °С.

Після визначення екстинкції повторно розведеного мінералізату за допомогою калібрувального графіку, визначають в ньому вміст азоту.

Проведення розрахунків:

Відсоткову масову долю білка розраховують за формулою:

$$C_x = C_k \cdot 250 \cdot 100 / (m \cdot 5 \cdot 1 \cdot 10^6) \cdot 6,25 \cdot 100,$$

де C_x – відсоткова масова доля білка в пробі, яка аналізується, %;

C_k – концентрація азота, яка знайдена по калібрувальному графіку у відповідності з визначеною екстинкцією (оптичною густиною), мкг/см³;

- m – наважка проби, яка аналізується, г;
 250 – об'єм первинно розведеного мінералізату, см^3 ;
 5 – об'єм первинно розведеного мінералізату для вторинного розведення, см^3 ;
 100 – об'єм вторинно розведеного мінералізату, см^3 ;
 l – об'єм розчину, який взятий для проведення кольорової реакції, см^3 ;
 10^6 – коефіцієнт перерахунку грамів у мікрограми;
 100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки;
 $6,25$ – коефіцієнт перерахунку азоту на білок.

Лабораторна робота 1.2. Кількісне визначення альдегідів (бензидинового числа) у тваринних жирах і в рослинних оліях спектрофотометричним методом.

Принцип методу. Наслідком пероксидного окиснення ліпідів є псування харчових продуктів – поява гіркоти. Це обумовлено утворенням альдегідів. В альдегідах карбоксильна група ($=\text{C}=\text{O}$) зв'язана з атомом водню і вуглеводневим радикалом (RCHO). Виняток становить найпростіший мурашиний альдегід – HCHO .

Одним з методів визначення кількості альдегідів – це визначення так званого бензидинового числа (Б.ч.), яке вираховується по кількості кольорового комплексу бензидину з альдегідами.

Матеріали для дослідження: тваринні жири та рослинні олії.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; терези аналітичні 2-го класу точності з межею зважування 200 г; годинник; хлороформ; спирт етиловий; бензидин; крижана оцтова кислота; колби мірні на 25 см^3 ; піпетки мірні 10 см^3 .

Хід роботи:

Наважку проби масою 0,5–1,0 г вносять у мірну колбу на 25 см^3 , розчиняють в суміші етилового спирту з хлороформом (1:1) та доводять до

мітки. Отриманий розчин через 15 хв. наливають у суху чисту кювету шириною 1 см і визначають екстинкцію (оптичну густина) на спектрофотометрі або фотоколориметрі при довжині хвилі 360 нм по відношенню до розчинника (спирт : хлороформ у співвідношенні 1:1). Отримане значення екстинкції характеризує забарвлення проби (E_1).

Потім в колбу з притертим корком вносять піпеткою 10 см³ розчину проби, в іншу колбу – 10 см³ розчинника (спирт : хлороформ у співвідношенні 1:1). В кожну колбу додають по 1 см³ 0,5 %-го свіжоприготовленого розчину бензидину (в суміші 1:1 етилового спирту та льодяної оцтової кислоти).

Вміст колб ретельно перемішують і витримують 15 хв, після чого визначають екстинкцію (оптичну густина) даного розчину по відношенню до розчинника, обробленого бензидином (E_2).

Проведення розрахунків:

Вміст альдегідів (бензидинове число, Б.ч.) на 100 г проби обчислюють за формулою:

$$\text{Б.ч.} = \frac{1,1(E_2 - E_1)0,0094 \cdot V}{m} \cdot 100,$$

де *Б.ч.* – бензидинове число (мг коричневого альдегіду на 100 г проби);

0,0094 – постійна величина, яка вказує на кількість коричневого альдегіду, яка приходить на одиницю оптичної густини при 360 нм;

V – об'єм, в якому розчинена наважка проби жиру, см³;

1,1 – поправка на зміну об'єму при додаванні до 10 см³ дослідного розчину 1 см³ 0,5 %-го розчину бензидину;

100 – коефіцієнт, який визначає розрахунок на 100 г проби;

E₁ і *E₂* – екстинкція (оптична густина) проби, яка аналізується, а також розчинника, що оброблений бензидином, відповідно.

Лабораторна робота 1.3. Визначення анізидинового числа в тваринних жирах і рослинних оліях спектрофотометричним методом.

Принцип методу: Анізидинове число – це міра концентрації вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, які зустрічаються в оліях і жирах. Високе анізидинове число жиру свідчить про тривалий час чи незадовільні умови його зберігання, або про те, що піддавали його тривалій механічній і термічній обробці. Навіть якщо готовий продукт із завищеним анізидиновим числом отримає високу дегустаційну оцінку, при зберіганні може відзначатися реверсія смаку. У світовій практиці якісний жир не перевищує анізидинове число із значенням 3.

Матеріали для дослідження: тваринні жири і рослинні олії.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; терези аналітичні 2-го класу точності; лабораторний термометр; ізооктан (2,2,4 – триметилпентан з нульовим поглинанням у діапазоні довжин хвиль від 300 до 380 нм); льодяна оцтова кислота; *n*-анізидин (4-метоксіанілін); дистильована вода; колби мірні місткістю 25 см³; піпетки мірні місткістю 1, 5 і 10 см³; штатив для пробірок.

Хід роботи:

Наважку проби (0,4 – 4,0 г) з точністю до 1 мг, переносять безпосередньо в мірну колбу місткістю 25 см³. Підігрівають тверді зразки (проби) до температури на 10 °С вище їх точки плавлення. Розчиняють пробу в 5-10 см³ 2,2,4-триметилпентану (ізооктану) і доводять до мітки тим самим розчином.

Готують ряд розчинів:

Нереагуючий аналітичний розчин: піпеткою переносять 5 см³ розчину розчиненої проби в пробірку № 1 місткістю 10 см³. Додають 1 см³ льодяної оцтової кислоти і після закриття пробірки корком ретельно перемішують.

Контрольний розчин: переносять 5 см³ чистого ізооктану в іншу пробірку № 2.

Проба для кольорової реакції: переносять 5 см³ розчину розчиненої проби у пробірку № 3.

Піпеткою додають в кожну з пробірок № 2 та № 3 1 см³ анізидинового реактиву (розчин *n*-анізидину в льодяній оцтовій кислоті (2,5 мг/ см³)). Закривають обидві пробірки корками і добре струшують. Витримують пробірки в темноті протягом 8 хв.

Протягом наступних 2 хв. переносять кожний з розчинів у суху чисту кювету спектрофотометра або колориметра. Через 10 хв. після додавання анізидинового реактиву проводять вимірювання.

Вимірюють екстинкцію (оптичну густина) на спектрофотометрі або фотоколориметрі при 350 нм нереагуючого, кольорового та контрольного розчинів по відношенню до ізооктану.

Якщо виміряна екстинкція кольорового розчину не знаходиться в межах від 0,2 до 0,8, повторюють визначення, відповідно змінивши величину наважки проби.

Проведення розрахунків:

Анізидинове число (А.ч.) проби обчислюють за формулою:

$$A.ч. = \frac{Q \cdot V}{m} 1,2(E_1 - E_2) - E_a \cdot 100,$$

де *A.ч.* – анізидинове число, у.о.;

m – маса проби, г;

V – об'єм, в якому розчинена проба, см³ (*V*=25 см³);

Q – вміст досліджуваної речовини в пробі, що аналізується, на основі якого виражається анізидинове число, у грамах на см³ (*Q*=0,01 г/ см³);

*E*₀ – екстинкція нереагуючого аналітичного розчину;

*E*₁ – екстинкція забарвленого розчину, який аналізується;

*E*₂ – екстинкція контрольного розчину;

1,2 – поправка на зміну об'єму при додаванні анізидинового реактиву;

100 – коефіцієнт, який визначає розрахунок на 100 г (см³) проби.

Лабораторна робота 1.4. Визначення вмісту каротинів рослин спектрофотометричним методом.

Принцип методу. Каротини – жиророзчинні оранжево–жовті пігменти рослин з групи каротиноїдів. Вони – попередники вітаміну А. За хімічною будовою це поліненасичені сполуки терпенового ряду. Розрізняють λ -, β -, γ - і Δ -каротини, які розрізняють між собою характером і числом іононових кілець, які входять до їх складу. Серед каротинів саме β -каротин є найактивнішим попередником вітаміну А.

Метод базується на відділенні каротинів від інших пігментів з наступним спектрофотометричним (фотоколориметричним) визначенням їх вмісту.

Матеріали для дослідження: морква.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; скляна хроматографічна колонка (довжина 15 см, діаметр 1,5–2,0 см); насос для відсмоктування рідини; терези аналітичні 2-го класу; фарфорова ступка з товкачиком; дистильована вода; безводний натрію сульфат; магнію карбонат; натрію оксалат; калію дихромат; високоочищений бензин; тальк; тампони з скловати; колба Бунзена місткістю 500 см³; мірна колба місткістю 100 см³; піпетки об'ємом 1–5 см³; скляна колонка (довжина 15 см, діаметр 1,5–2,0 см).

Хід роботи:

Наважку 1 г моркви розтирають в ступці з 2 г безводного натрію сульфату і 0,5 г магнію карбонату. Після отримання розтерту суміш залишають на 5 хв для підсушування.

Для відділення каротинів від інших пігментів використовують скляну хроматографічну колонку (довжиною 15 см, діаметр 1,5–2,0 см), яку попередньо готують наступним чином: в нижню частину вміщують тампон з скловати, потім насипають 10 г розтертої в ступці суміші натрію оксалату: тальк (1:1) і ущільнюють; зверху цієї суміші вміщують тампон з скловати.

Приготовлену колонку прилаштовують до колби Бунзена, а саму її приєднують до насосу. В подальшому в колонку вносять розтерту суміш моркви з натрію сульфатом і магнію карбонатом. Ступку, де відбувалося розтирання зразка моркви, ополіскують 5 см³ високоочищеного бензину і його вливають в колонку. Потім вмикають насос і відсмоктують бензиновий елюат (містить екстракт зразка, що аналізується) з швидкістю 50 – 60 крапель за хвилину. Колонку промивають декількома порціями бензину по 3 см³ до повного видалення нижньої яскравожовтої смуги каротинів, яка попереджує іншим пігментам (ксантофілам – блідножовта смуга і хлорофілу *a* – синя смуга). Розчин каротинів доводять до об'єму 10 см³ бензином і спектрофотометрують (фотоколориметрію), тобто визначають екстинкцію, при довжині хвилі 490 нм.

Екстинкцію бензинового елюата порівнюють з екстинкцією стандартного розчину. Ним може бути стандартний розчин каротинів або розчин калію дихромату (K₂Cr₂O₇), забарвлення якого подібне забарвленню каротинів (яскравожовте). Стандартний розчин K₂Cr₂O₇ готують наступним чином: 72 мг цієї речовини вносять у мірну колбу місткістю 100 см³, розчиняють у 10–20 см³ дистильованої води і ретельно перемішують, а потім доводять до мітки і ще раз перемішують, 1 см³ такого розчину має 0,00416 мг каротинів.

Проведення розрахунків:

Розрахунок вмісту каротинів у пробі, яка аналізується, розраховують за формулою:

$$C_x = \frac{E_1 \cdot C_{ст} \cdot V}{m \cdot E_2} \cdot 100,$$

де C_x – вміст каротинів у пробі, яка аналізується, мг %;

$C_{ст}$ – вміст каротинів у стандартному розчині, мг/см³;

E_1 – екстинкція розчину каротинів, який аналізується;

E_2 – екстинкція стандартного розчину каротинів або K₂Cr₂O₇;

V – об'єм бензинового елюату каротинів, см³;

m – маса проби, яка аналізується, г;

100 – коефіцієнт, який визначає перерахунок на 100 г проби.

Лабораторна робота 1.5. Кількісне визначення ретинолу (вітаміну А) в тваринних продуктах спектрофотометричним методом.

Принцип методу. Групу вітамінів А складають вітамін А₁ (ретинол) і А₂ (дегідроретинол). З печінки китів виділена речовина, яка володіє А-вітамінною активністю, вона названа вітаміном А₃. Це жиророзчинні речовини, які за хімічною структурою є ненасиченим спиртом, що містить β-іононове кільце та залишки ізопрену.

Метод заснований на лужному гідролізі та екстракції вітаміну А подрібненої тканини за допомогою слабколетких розчинників та наступному спектрофотометричному вимірі поглинання світла розчином до і після руйнування вітаміну А ультрафіолетовими променями при довжині хвилі 328 нм.

Матеріали для дослідження: печінка, пташинні яйця.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр; ультрафіолетова лампа типу ПРК-4; центрифуга (1 500–2 000 об./хв.); водяна баня; вентилятор настільний; лабораторний термометр; фарфорова ступка з товкачиком; годинник; пробірки зі скла «Пірекс», що пропускає ультрафіолетові промені, розміром 55 x 8 мм; центрифужні пробірки; штатив для пробірок; піпетки градуйовані на 1, 5 і 10 см³; скляні палички; 96 %-й спирт етиловий, ксилол або проксилол; октан; 1 н. розчин калію гідроксиду в 96 %-му етиловому спирті; дистильована вода.

Хід роботи:

Пред проведенням досліджень спочатку готують необхідний розчин калію гідроксиду і ксилоло-октанову суміш:

1. До 1 об'єму 11 н. розчину калію гідроксиду (11 н. розчин калію гідроксиду: 617,16 мг калію гідроксиду вносять у мірну колбу місткістю 1 дм³ і доводять до мітки дистильованою водою) додати 10 об'ємів етилового спирту. Розчин готується в день проведення аналізів.

2. Ксилоло-суміш (1:1), готують у день проведення аналізів.

Для дослідження використовують свіжу печінку або ту, що зберігалася в замороженому стані. Пробу печінки ретельно розтирають у фарфоровій ступці, потім зважують 2,0 г отриманої гомогенної маси. У такий же спосіб готують для аналізу пробу жовтка пташиних яєць, але жовток у кількості 2 г зважують безпосередньо в центрифужну пробірку.

Наважку гомогенізованої печінки 2 г або 2 г жовтка пташиних яєць, кількісно переносять у центрифужну пробірку і доливають 2 см³ 1 н. спиртового розчину калію гідроксиду. Перемішують скляною паличкою до утворення однорідної суміші і ставлять для гідролізу на водяну баню при температурі 60°C на 30 хв. Після цього пробірки охолоджують у холодній воді ($t \approx 4^\circ\text{C}$) протягом 5 – 10 хв і додають у кожную 8 см³ ксилоло-октанової суміші. Пробірки закривають корками і ретельно струшують протягом 2 хв, після чого центрифугують 5 хв при 1 500 об./хв. Верхній шар центрифугату переносять піпеткою в кварцову кювету спектрофотометра і визначають екстинкцію (оптичну густину) шляхом дворазового виміру, до і після опромінення проб ультрафіолетовими променями при довжині хвилі 328 нм. Для опромінення досліджувані проби переносять з кювет у пробірки зі скла «Пірекс» і опромінюють 45 – 60 хв ультрафіолетовою лампою ПРК-4 на відстані 15 –19 см. Для того щоб пробірки не нагрівалися, під час опромінення їх охолоджують за допомогою настільного вентилятора.

Проведення розрахунків:

Концентрацію ретинолу (вітаміну А) в пробі обчислюють за формулою:

$$C = \frac{6,37 \cdot (E_1 - E_2) \times k}{2},$$

де C – кількість ретинолу (вітаміну А) в пробі, мкг/г;

$6,37$ – коефіцієнт перерахунку для вітаміну А;

2 – коефіцієнт перерахунку на 1 г проби;

E_1 – екстинкція розчину вітаміну А до опромінення при довжині хвилі 328 нм;

E_2 – екстинкція розчину вітаміну А після опромінення при довжині хвилі 328 нм;

k – коефіцієнт розведення (кількість см³ ксилоло-октанової суміші).

Лабораторна робота 1.6. Кількісне визначення токоферолів (вітаміну Е) в тваринних продуктах спектрофотометричним методом.

Принцип методу. Вітамін Е – це загальна назва токоферолів (α -, β -, γ -токоферолу), які є похідними токолу і відрізняються за числом та розташуванням метильних груп у бензольному кільці; найбільш активним є α -токоферол.

Метод визначення вітаміну Е заснований на фотометричному визначенні інтенсивності забарвлення при кольоровій реакції вітаміну Е (α -токоферолу) із залізодипіридиловим реактивом.

Матеріали для дослідження: печінка, пташині яйця.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; ступка фарфорова з товкачиком; терези аналітичні 2-го класу точності; центрифуга (1 500 – 2 000 об./хв.); годинник; лабораторний термометр; водяна баня; ацетон; петролейний етер (40 – 60); 85 %-а сульфатна кислота; 2 %-й розчин калію гідроксиду; бензол; залізодипіридиловий реактив (спосіб приготування: 250 мг заліза хлорного і 500 мг 2,2–дипіридилу розчиняють у 1 дм³ льодяної оцтової кислоти, реактив стабілізується на 7 – 10 день, зберігається при кімнатній температурі в посудині з темного скла); дистильована вода; ділильна лійка місткістю на 250 – 500 см³; колба на 50 см³; центрифужні пробірки; балон газу азоту; фільтрувальний папір «синя стрічка» з усім необхідним для фільтрування.

Хід роботи:

Наважку печінки або жовтка пташиних яєць 2 г ретельно подрібнюють і розтирають у фарфоровій ступці, заливають 30 см³ ацетону, знову розтирають, дають відстоятися і верхній шар декантують, одночасно фільтруючи через паперовий фільтр. Повторно вітамін А екстрагують в 30 см³ суміші (15 см³ ацетону і 15 см³ петролейного етеру), третій раз сумішшю (10 см³ ацетону і 20 см³ петролейного етеру). Екстракти, зібрані в ділильну лійку, 2 рази промивають 2 – 3-кратним об'ємом дистильованої води. Екстракт з петролейним етером переносять у колбу і на водяній бані при температурі 60 °С випаровують у струмі газу азоту до об'єму 1,5 – 2 см³. Залишок виливають у градуйовану пробірку (центрифужну). Колбу обполіскують 1 – 2 см³ петролейного етеру, що зливають у центрифужну пробірку, і об'єм рідини в пробірці доводять петролейним етером до 5 см³.

Для осадження вітамінів А і каротиноїдів у пробірку до екстракту додають 2 – 3 см³ 85 %-ї сульфатної кислоти, ретельно перемішують вміст пробірки протягом 2 – 3 хв (струшуванням), а потім для поділу шарів центрифугують 5 хв при 1 500 об./хв. Надосадову рідину піпеткою переносять в іншу центрифужну пробірку в кількості 3,0 см³ і залишок кислоти в ній нейтралізують 2 %-м розчином калію гідроксиду. Ретельно перемішують 1 – 2 хв., потім центрифугують 5 хв., 3 см³ надосадової рідини випарюють на водяній бані при температурі 60 °С у струмі газу азоту. Осад розчиняють у 1 см³ бензолу, додають 2,0 см³ залізодипіридилового реактиву. Витримують 20 хв. у темноті і спектрофотометрують (фотоколориметрують) при довжині хвилі 490 нм, у кюветі з робочою відстанню 5 мм проти контролю. Контролем служить розчин бензолу і залізодипіридиловий реактив.

Для визначення концентрації вітаміну Е в пробі необхідно попередньо побудувати калібрувальний графік – залежність інтенсивності забарвлення (оптичної густини) від концентрації стандарту вітаміну Е.

Приготування розчинів α -токоферолу для побудови калібрувального графіка:

- 1) 200 мг кристалічного α -токоферолу розчиняють у мірній колбі місткістю 10 см³ бензолом і доводять до мітки (концентрація – 20 мг/см³) – основний розчин;
- 2) 2,5 см³ основного розчину переносять у мірну колбу місткістю 25 см³ і доводять бензолом до мітки (концентрація – 2 мг/см³);
- 3) до 5 см³ розчину 2 мг/см³ додають 5 см³ бензолу (концентрація – 1 мг/см³);
- 4) до 5 см³ розчину 1 мг/см³ додають 5 см³ бензолу (концентрація – 0,5 мг/см³);
- 5) до 5 см³ розчину 0,5 мг/см³ додають 5 см³ бензолу (концентрація – 0,25 мг/см³);
- 6) до 5 см³ розчину 0,25 мг/см³ додають 5 см³ бензолу (концентрація – 0,125 мг/см³).

Далі в пробірки до 1 см³ кожного розведеного розчину додають 1 см³ бензолу і 2 см³ залізодипіридилового реактиву. Контроль: 2 см³ бензолу і 4 см³ залізодипіридилового реактиву.

Проведення розрахунків:

Вміст вітаміну Е обчислюють за формулою:

$$E = \frac{a \cdot v \cdot 1\,000}{m},$$

де E – концентрація вітаміну Е в пробі, мг/кг;

a – кількість вітаміну Е в пробі, яка знайдена по калібрувальному графіку, мг;

v – ступінь розведення;

m – наважка проби, г;

1 000 – коефіцієнт перерахунку концентрації вітаміну Е з мг/г проби в мг/кг проби.

Лабораторна робота 1.7. Кількісне визначення тіаміну (вітаміну В₁) в тваринних продуктах спектрофлуориметричним методом.

Принцип методу. Тіамін (вітамін В₁) за хімічною будовою складається з піридинового і тiazолового кілець, які з'єднані між собою метильним містком. В організмі тварин і людини тіамін знаходиться як у вигляді вільного тіаміну (1 – 10 %), так і його фосфорильованих похідних – тіамінмонофосфату (до 5 %), тіаміндифосфату (70 – 80 %) і тіамінтрифосфату (до 10 %). Тіамінпірафосфат є кофактором ряду ферментів, який виконує функцію проміжного переносника альдегідної групи.

Метод базується на окисненні тіаміну в лужному середовищі в тіохром, який екстрагується з проби розчинником, і в порівнянні інтенсивності флуоресценції розчинів, які аналізуються, з окисненими стандартними розчинами тіаміну.

Матеріали для дослідження: печінка або червоні м'язи.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофлуориметр; гомогенізатор або фарфорова ступка з товкачиком і кварцевий пісок; термостат; водяна баня; годинник; водяний розчин сульфатної кислоти (0,1 моль/дм³); толуен; водяний розчин натрію ацетату (2,5 моль/дм³), що містить фермент фосфатазу (рН 4,0–4,5); 20 %-й водяний розчин трихлороцтової кислоти; 30 %-й водяний розчин натрію гідроксиду; 2 %-й водяний розчин калію гексаціано (III)-ферату (K₃[Fe(CN)₆]); ізоаміловий і етиловий спирт; стандартний водяний розчин тіаміна (1 мкг/см³); дистильована вода; конічна колба місткістю 100 см³, лійка для фільтрування; мірний циліндр місткістю 50 см³; ділильні лійки місткістю 100 см³; пробірки з притертим скляним корком місткістю 10 см³; крапельниця; градуювальні піпетки об'ємом 5 і 10 см³; штатив для пробірок; фільтрувальний папір «синя стрічка» з усім необхідним для фільтрування.

Хід роботи:

Наважку 2 г свіжої тканини (печінки чи червоних м'язів) гомогенізують або перетирають у фарфоровій ступці з кварцевим піском при додаванні невеликими частками 10 см^3 $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчину сульфатної кислоти.

Отриманий гомогенат переносять у конічну колбу і доводять об'ємом суміші приблизно до 75 см^3 $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчином сульфатної кислоти. Вміст колби нагрівають на киплячій водяній бані при частому перемішуванні проягом 45 хв. Після охолодження в колбу додають 2–3 краплини толуену і 5 см^3 $2,5 \text{ моль/дм}^3$ розчину натрію ацетату, що містить фермент фосфатазу (рН 4,0 – 4,5). Для перебігу ферментативної реакції, внаслідок якої звільняється зв'язаний тіамін, колбу поміщають в термостат при температурі $40 \text{ }^\circ\text{C}$ на 2 год. Після охолодження до колби вносять 10 см^3 20 %-го розчину трихлороцтової кислоти і через 10 хв. переносять у мірну колбу місткістю 100 см^3 , доводять об'єм суміші дистильованою водою до мітки, ретельно перемішують і фільтрують через складчастий паперовий фільтр у плоскодонну колбу. Отриманий фільтрат в об'ємі 50 см^3 переносять в ділильну лійку, додають 25 см^3 ізоамілового спирту і струшують (в ручну) протягом 2 хв. Після розшарування суміші спиртову фазу відкидають. Цю операцію повторюють 2–3 рази і водні фази об'єднують і в подальшому працюють з водною витяжкою.

Кількість $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, яка необхідна для окиснення тіаміну, визначають наступним чином. У 6 пробірок з притертими скляними корками вносять по 2 см^3 30 %-го розчину натрію гідроксиду і по 5 см^3 отриманої профільтрованої витяжки тіаміну. В 5 пробірок додають свіжоприготовлений 2 %-й розчин $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, об'ємом 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 і $0,5 \text{ см}^3$, відповідно. Ще одна (6-та) пробірка слугує контролем, в яку замість $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ додають $0,5 \text{ см}^3$ дистильованої води.

В деяких з 5-ти пробірок виникає жовте забарвлення. В тій з сумішей, де доданий об'єм окисника викликає найяскравіше забарвлення, яке не зникає

протягом 30 с після струшування, і є оптимальною для подальших досліджень.

За наявності спектрофотометра або фотоколориметра найкраще оптимальний об'єм $K_3[Fe(CN)_6]$ визначити за показником екстинкції (оптичної густини) при довжині хвилі 360 нм проти контролю (вмісту 6-ї пробірки).

На наступному етапі у дві ділильні лійки вносять по 2 см³ 30 %-го розчину натрію гідроксиду і в одну з них, яка буде пробою що аналізується – визначений оптимальний об'єм 2 %-го розчину $K_3[Fe(CN)_6]$, ретельно перемішують. В подальшому обидві лійки (друга з них, яка не містить $K[Fe(CN)_6]$ буде контрольною) швидко вносять по 5 см³ отриманого екстракту тіаміну, вміст лійок ретельно струшують, в кожному з них додають по 10 см³ ізоамілового спирту і протягом 2 хв інтенсивно струшують. По завершенні розшарування суміші водну фазу видаляють, а ізоаміловий шар ще раз промивають 5 см³ дистильованої води. В обидві ділильні лійки додають по 2 см³ етилового спирту для просвітлення розчинів. Суміш, яка аналізується, і контрольну знову ретельно струшують і визначають їх флуоресценцію (див. нижче).

Стандартний водний розчин тіаміну, який містить 1 мкг/см³, окиснюють таким же чином як і той, що містить дослідну пробу (екстракт з тканин). Для цього використовують 0,05 см³ 2 %-го розчину $K_3[Fe(CN)_6]$. Для визначення можливого впливу домішок в стандартній пробі, які здатні впливати на флуоресцентні характеристики як контроль використовують 1 см³ стандартного водного розчину тіаміну, який обробляють вищенаведеним способом, але без додавання $K_3[Fe(CN)_6]$.

При визначенні вмісту тіаміну в пробі, яка аналізується флуоресцентним методом довжина хвилі збудження ($\lambda_{збуд.}$) – 360 нм, а довжина хвилі випромінювання ($\lambda_{вип.}$) – 460 нм.

Проведення розрахунків:

Концентрацію тіаміну в пробі мкг, яка аналізується визначають за формулою:

$$C = \frac{(E_1 - E_2) \cdot V \cdot 1000}{(E_3 - E_4) \cdot m \cdot V_1},$$

де C – концентрація тіаміну в пробі, яка аналізується, мкг/кг;

E_1 – інтенсивність флуоресценції екстракту проби, яка аналізується, після окиснення тіаміну в тіохром $K_3[Fe(CN)_6]$;

E_2 – інтенсивність флуоресценції екстракту проби, яка аналізується, без окиснення тіаміну в тіохром $K_3[Fe(CN)_6]$;

E_3 – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину тіаміну, що містить 1 мкг вітаміну, після окиснення тіаміну в тіохром $K_3[Fe(CN)_6]$;

E_4 – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину тіаміну, що містить 1 мкг вітаміну, безокиснення тіаміну в тіохром $K_3[Fe(CN)_6]$;

V – загальний об'єм вітамінного екстракту, см³;

V_1 – об'єм вітамінного екстракту, взятий для аналізу, см³;

m – маса проби (тканини), яка взята для аналізу, г;

1 000 – коефіцієнт перерахунку концентрації тіаміна з мкг/г проби в мкг/кг проби.

Лабораторна робота 1.8. Кількісне визначення рибофлавіну (вітаміну В₂) в ікрі риб спектрофлуориметричним методом.

Принцип методу. Рибофлавін (вітамін В₂) за хімічною будовою складається із з'єднаних між собою бензольного, піразинового і пірисмідинового кілець, до якого (піразинового кільця) приєднаний залишок спирту рибітолу.

Рибофлавін входить до складу флавінмононуклеотиду (ФМН) і флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), які є коферментами флавінзалежних дегідрогеназ.

Метод визначення вмісту рибофлавіну базується на його вивільненні зі зв'язаної форми в коферментах шляхом кислотного гідролізу і обробки препаратом фермента фосфатазою, а також порівнянні інтенсивності флуоресценції розчинів, які аналізуються (екстрактів) з стандартними розчинами рибофлавіну.

Матеріали для дослідження: ікра риби.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофлуориметр; гомогенізатор або фарфорова ступка з товкачиком; водяна баня; термостат; годинник; водний розчин сульфатної кислоти ($0,1$ моль/дм³); толуен; водний розчин натрію ацетата ($2,5$ моль/дм³), що містить фермент фосфатазу (рН $4,0-4,5$); 4% -й водний розчин калію перманганату; 3% -й розчин водню пероксиду; насичені розчини SnCl_2 і Na_2SO_4 ; стандартний водний розчин рибофлавіну (10 мкг/см³); дистильована вода; конічні колби місткістю 100 см³; калібровані пробірки об'ємом 10 см³; градувальні піпетки об'ємом 5 і 10 см³; крапельниця; лійка для фільтрування; фільтрувальний папір «синя стрічка».

Хід роботи:

Наважку 2 г ікри риби ретельно гомогенізують, розтирають у фарфоровій ступці з 10 см³ розчину сульфатної кислоти ($0,1$ моль/дм³), яку додають невеликими порціями. Гомогенат переносять в конічну колбу місткістю 100 см³ і доводять об'єм суміші приблизно до 75 см³ розчином сульфатної кислоти ($0,1$ моль/дм³). Вміст колби нагрівають протягом 45 хв на киплячій водній бані при частому перемішуванні. Після охолодження в колбу додають $2-3$ краплини толуену і 5 см³ розчину натрію ацетату ($2,5$ моль/дм³), що містить фермент фосфатазу (рН $4,0-4,5$). Для перебігу ферментативної реакції, внаслідок якої звільнюється зв'язаний рибофлавін, колбу поміщають на 2 год в термостат при температурі 40 °С. Після охолодження вміст цієї колби переносять у мірну колбу місткістю 100 см³,

доводять об'єм суміші дистильованою водою до мітки, ретельно перемішують і фільтрують через складчастий фільтр у колбу.

Основний стандартний розчин рибофлавіну готують наступним чином: 10 мг розтертого в ступці рибофлавіну розчиняють в 100 см³ (у мірній колбі місткістю 100 см³). В цьому випадку стандартний водний розчин рибофлавіну містить цей вітамін в концентрації 10 мкг/см³.

В подальшому в одну з калібрувальних пробірок вносять 8 см³ профільтрованої витяжки, а в іншу – 7 см³ дистильованої води і 1 см³ стандартного розчину рибофлавіну. Потім в обидві пробірки краплинами додають однакові кількості 4 %-го розчину калію перманганату до появи блідорожевого забарвлення. Через 10 хв. в ці пробірки для руйнування надлишку калію перманганата додають також краплинами (2 – 5 крапель) 35 %-й розчин водню пероксиду, доводять об'єм в обох пробірках дистильованою водою до 10 см³ і ретельно перемішують.

Наступний етап – це вимір інтенсивності флуоресценції сумішей обох пробірок за умов: довжина хвилі збудження ($\lambda_{збуд.}$) – 430 нм, а довжина хвилі випромінювання ($\lambda_{випр.}$) – 565 нм. Після визначення інтенсивності флуоресценції в ці обидві пробірки додають по 0,2 см³ насиченого розчину SnCl₂ і 0,1 см³ Na₂SO₄ для гасіння флуоресценції рибофлавіну і вимірюють можливу флуоресценцію домішок за тих же умов.

Проведення розрахунків:

Концентрацію рибофлавіну в пробі, яка аналізується, обчислюють за формулою:

$$C = \frac{(E_1 - E_2) \cdot V \cdot V_1 \cdot a \cdot 1000}{(E_3 - E_4) \cdot V_2 \cdot m},$$

де C – концентрація рибофлавіну в пробі, яка аналізується мкг/кг;

E_1 – інтенсивність флуоресценції екстракту проби, яка аналізується;

E_2 – інтенсивність флуоресценції екстракту проби, яка аналізується, після гасіння флуоресценції;

E_3 – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину рибофлавіну;

E_4 – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину рибофлавіну після гасіння флуоресценції;

a – концентрація рибофлавіну в стандартному розчині, мкг/см³;

V – загальний об'єм витяжки рибофлавіну, см³;

V_1 – об'єм екстракту проби, яка аналізується, що взятий для вимірювання флуоресценції, см³;

V_2 – відібрана аліквота екстракту проби для аналізу, см³;

m – маса проби (ікри), яка взята для аналізу, г;

$1\ 000$ – коефіцієнт перерахунку концентрації рибофлавіну з мкг/г на мкг/кг .

Лабораторна робота 1.9. Визначення вмісту нітратів і нітритів спектрофотометричним методом.

Принцип методу. Нітрати – це солі нітратної кислоти (HNO₃), які є продуктами обміну азотистих речовин. Вони не проявляють вираженої токсичної дії, але здатні відновлюватися до нітритів – солей нітритної кислоти (HNO₂). Ці сполуки при взаємодії з гемоглобіном крові викликають утворення метгемоглобіну, який не здатний зв'язувати і преносити кисень. Крім того, з нітритів у присутності амінів можуть утворюватися N – нітросоаміни, які проявляють канцерогенну дію.

Основне джерело надходження нітратів і нітритів в організм людини – продукти рослинного походження (60–85 % добового надходження нітратів припадає на овочі). Ця проблема пов'язана зі зростаючим і часто безконтрольним застосуванням азотистих добрив (неправильне дозування і терміни внесення), використанням деяких гербіцидів (наприклад, дихлорфеноксоцтової кислоти, 2,4–Д), дефіцитом молібдену в ґрунті та ін., що порушує обмін речовин у рослинах і сприяє накопиченню ними нітратів.

Крім рослин, джерелами нітратів і нітритів є м'ясні продукти, а також риба і сири, в які додають натрій або калій нітрит як консервант і для збереження природного кольору м'ясопродуктів.

Метод визначення нітратів і нітритів базується на екстрагуванні проби, яка аналізується, гарячою водою, осадження білків калію фероціанідом (калію заліzosинеродистим (II), $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) і ацетатом цинку. Нітрати відновлюють до нітритів металевим кадмієм, а при додаванні до них хлориду сульфаніламідів і N – (1-нафтил) дигідрохлоридетилендіаміну утворюється забарвлена в червоний колір комплексна сполука, кількість якої визначають спектрофотометрично.

Матеріали для дослідження: буряки столові, капуста білоголова, цибуля перо, петрушка або інші овочі.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр; терези аналітичні 2-го класу точності; водяна баня; лабораторний термометер; мішалка вертикальна механічна; термостат; шпатель, кінець якого покритий політетрафторетиленом (ПТФЕ); паличка для перемішування, кінець якої розплющений і покритий ПТФЕ; годинник; рН-метр (іонометр); натрію тетраборнокислий; калій фероціанід (калію заліzosинеродистий (II) тригідрат; концентрований розчин аміаку; цинку ацетат; сульфаніламід; кислота хлорводнева; N-(1-нафтил) дигідрохлоридетилендіамін; металевий цинк; хлорид амонію; натрію нітрат; дистильована вода; циліндр мірний місткістю 50 см³; колби мірні місткістю 50, 100, 200 і 1 000 см³; колби конічні з притертими скляними корками місткістю 25 см³; скляний хімічний стакан місткістю 250 см³; піпетки місткістю 1 – 10 см³; лійка; папір фільтрувальний гафрований без нітратів і нітритів.

Хід роботи:

Перед проведенням досліджень готують розчини необхідних реактивів:

1. Розчин натрію тетраборнокислий: розчиняють 50 г натрію тетраборнокислового ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) в 1 дм³ теплої (30 – 40 °С) води і охолоджують до кімнатної температури.

2. Розчин калію фераціаніда (II): в мірній колбі місткістю 1 дм³ розчиняють 106 г калію фераціаніда (калію залізосинеродистого (II), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) і доводять дистильованою водою до мітки.

3. Розчин цинку ацетату: в мірній колбі місткістю 1 дм³ розчиняють 200 г цинку дігідрат ацетату ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) і 30 см³ льодяної оцтової кислоти і доводять дистильованою водою вміст колби до мітки.

4. Реактив для розвитку забарвлення складається з трьох розчинів:

Розчин I: в мірній колбі місткістю 200 см³ розчиняють 0,4 г сульфаніламід у 100 см³ дистильованої води і нагрівають на водяній бані до температури 80 – 90 °С; розчин охолоджують, за необхідності фільтрують, потім під час збовтування додають 20 см³ хлорводневої кислоти ($\rho_{20} = 1.19$ г/см³), доводять дистильованою водою до мітки і ретельно премішують.

Розчин II: в мірній колбі місткістю 100 см³ розчиняють 0,1 г N-(1-нафтил) дигідрохлоридетилендіаміну ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$) доводять дистильованою водою до мітки і перемішують.

Розчин III: в мірній колбі місткістю 1 дм³ розводять 445 см³ хлорводневої кислоти.

5. Розчин кадмію сульфату: в мірній колбі місткістю 1 дм³ розчиняють 40 г кадмію октагідрат сульфату ($\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) дистильованою водою доводять до мітки і перемішують.

6. Розчин аналітичний буферний (рН 9,6): в мірній колбі місткістю 1 дм³ розчиняють 37,4 г амонію хлориду (NH_4Cl) в 0,9 дм³ дистильованої води; концентрованим розчином аміаку ($\rho_{20} = 0.88$ г/см³) регулюють рН до 9,6; доводять дистильованою водою до мітки.

7. Стандартний розчин натрію нітриту: наважку натрію нітриту (NaNO_2), який заздалегідь висушений при температурі 115°C до постійної маси, вносять в мірну колбу місткістю 1 дм^3 , розчиняють в 50 см^3 дистильованої води і ретельно перемішують; доводять дистильованою водою до мітки; 5 см^3 цього розчину переносять в мірну колбу місткістю 1 дм^3 і доводять дистильованою водою до мітки. В 1 см^3 цього стандартного розчину міститься 10 мкг нітрит-іонів.

За методикою визначення вмісту натрію нітрату його відновлюють в нітрити металевим кадмієм. За відсутності металевого кадмію його можна отримати з кадмію сульфату. Для цього в скляний хімічний стакан місткістю 250 см^3 додають розчин кадмію сульфату (див. вище), поміщають стрижні металевого цинку (довжина 150 мм , діаметр $5\text{--}7\text{ мм}$) і залишають на 1 год . Регулярно зішкрібають шпателем відновлений кадмій і його подрібнюють паличкою. Отриманий і зібраний кадмій з цинкових стрижнів оброблюють хлорводневою кислотою ($0,1\text{ моль/дм}^3$), кілька разів промивають дистильованою водою, подрібнюють і зберігають у дистильованій воді.

Визначення вмісту нітритів:

Наважку проби від 1 до 10 г після подрібнення (або від 1 до 10 см^3 рідини після розмороження в закритій посудині заморожених продуктів в залежності від припустимого вмісту нітритів) вносять в скляний хімічний стакан місткістю 250 см^3 і додають 5 см^3 розчину натрію тетраборнокислого і приблизно 100 см^3 гарячої ($70\text{--}80^\circ\text{C}$) дистильованої води. Потім нагрівають стакан 15 хв . на киплячій водяній бані, час від часу струшуючи. Послідовно додають по 2 см^3 розчину калію фероціаніду і цинку ацетату, струшують кожний раз.

Після охолодження вміст хімічного стакану переносять в мірну колбу місткістю 200 см^3 , ополіскують дистильованою водою стакан і цей розчин додають в ту ж мірну колбу. Об'єм колби доводять дистильованою водою до мітки, ретельно перемішують.

Отриманий розчин фільтрують крізь гафрований фільтрувальний папір, а у разі потреби фільтрування повторюють.

В подальшому аліквоту фільтрату (не менше 10 см³) переносять в мірну колбу місткістю 50 см³ і розводять приблизно 30 см³ дистильованої води. Потім до цього розчину додають 5 см³ розчину I і 3 см³ розчину III для розвитку забарвлення, ретельно перемішують і на 3–5 хв. залишають в захищеному від світла місці при кімнатній температурі. В подальшому додають 1 см³ розчину II для розвитку забарвлення; ретельно перемішують і залишають протягом 3–5 хв. за кімнатної температури в захищеному від світла місці. Вміст колби доводять дистильованою водою до мітки.

Протягом 15 хв. вимірюють екстинкцію (оптичну густину) отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 538 нм.

Проводять також приготування контрольної проби, як і досліджуваної, але замість проби, яка аналізується, беруть 10 см³ дистильованої води. Вимірюють за тих же умов її екстинкцію.

Від числових значень екстинкції екстракту проби, яка аналізується, віднімають значення отриманої екстинкції контрольної проби. Отримані значення екстинкції і будуть такими, що використовуються для визначення вмісту нітритів в пробі, яка аналізується, за використання калібрувального графіка.

Для побудови калібрувального графіка у шість мірних колб місткістю 50 см³ поміщають, відповідно 0; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5 і 3,0 см³ стандартних розчинів натрію нітрита, які містять 0,5; 10; 20; 25 і 30 мг натрію нітриту, а також відповідно 30; 29,5; 29,0; 28,0; 27,5 і 27,0 см³ дистильованої води. З отриманими розчинами стандартів натрію нітриту проводять всі ті ж процедури, що із профільтованим екстрактом проби, яка аналізується, починаючи з додавання реактиву для розвитку забарвлення. Після проведення всіх процедур отримані калібрувальні розчини спектрофотометрують при тій же довжині хвилі (538 нм).

При побудові калібрувального графіка по вісі абсцис відкладають значення маси нітритів (в мкг) у калібрувальних розчинах, а по вісі ординат – відповідні значення екстинкції, яку вимірювали на спектрофотометрі.

Проведення розрахунків:

Масову частку нітритів в міліграм нітрит-іону (NO_2^-) на кілограм проби або міліграм нітрит-іону (NO_2^-) на дециметр кубічний (за рідкого стану проби), яка аналізується, обчислюється за формулою:

$$C = m_1 \cdot \frac{200}{V_1 \cdot m_0}$$

або

$$C = m_1 \cdot \frac{200}{V_1 \cdot V_0},$$

де C – масова частка нітритів, мг $\text{NO}_2^-/\text{кг}$ або мг $\text{NO}_2^-/\text{дм}^3$;

m_0 – маса проби яка аналізується, г;

m_1 – маса нітрит-іонів (NO_2^-), що міститься в аліквоті проби (V_1) фільтрату і визначена за калібрувальним графіком, мкг;

V_0 – об'єм проби, яка аналізується (за її рідкого стану);

V_1 – об'єм досліджуваної аліквати проби фільтрату екстракту, см^3 ;

200 – коефіцієнт перерахунку згідно методики.

Визначення вмісту нітратів:

Відбір проби, яка аналізується, а також отримання профільтрованого екстракту проводять таким же чином, як і при визначенні вмісту нітритів (див.вище).

В подальшому аліквату профільтрованого екстракту проби (10 см^3 або менше в залежності від припустимого вмісту нітратів в цій пробі) додають в конічну колбу місткістю 25 см^3 , до неї поміщають також 2 г металевого кадмію і 5 см^3 розчину аналітичного буферного (див. вище). Колбу закупорюють скляним корком та струшують на вертикальній механічній

мішалці протягом 5 хв. В цьому процесі відбувається відновлення нітратів у нітрити.

В подальшому вміст цієї колби фільтрують через фільтрувальний папір, який не містить нітритів, фільтрат збирають в мірну конічну колбу місткістю 50 см³. Дистильованою водою декілька раз ополіскують фільтрувальний папір і зливи додають в ту ж колбу. Об'єм цієї колби доводять дистильованою водою до мітки.

Потім відбирають 10 см³ цього фільтрату і в ньому визначають утворені нітрити, (що виникли при відновленні нітратів), як описано в ході роботи по визначенню нітритів (див.вище).

Проведення розрахунків:

Масову частку нітратів (міліграм нітрат-іонів (NO₃⁻) на кілограм або міліграм нітрат-іонів (NO₃⁻) на дециметр кубічний (за рідкого стану проби) в пробі, яка аналізується, обчислюють за формулою:

$$C = 1,348 \cdot \frac{m_2 \cdot 10\,000}{V_2 \cdot V_3 \cdot m_0} - \frac{m_1 \cdot 200}{V_1 \cdot m_0}$$

або

$$C = 1,348 \cdot \frac{m_2 \cdot 10\,000}{V_2 \cdot V_3 \cdot V_0} - \frac{m_1 \cdot 200}{V_1 \cdot m_0},$$

де C – масова частка нітратів, мг NO₃⁻/кг або мг NO₃⁻/дм³;

m_0 – маса проби яка аналізується, г;

m_1 – маса нітрит-іонів (NO₂⁻), що міститься в алікваті проби (V_1) фільтрату що визначена за калібрувальним графіком, мкг;

m_2 – загальна маса нітритів, яка виражена в міліграмах нітрит-іонів (NO₂⁻), яку містить об'єм (V_2) дослідного розчину, мг;

V_0 – об'єм проби, яка аналізується (за її рідкого стану);

V_1 – об'єм досліджуваної аліквоти проби фільтрату екстракту, см³.

V_2 – об'єм дослідного розчину, який був використаний для спектрометричного вимірювання, см³;

V_3 – об'єм аликвоти проби фільтрату, який використовували для приготування розчину, який аналізується, см³;

1,348 – коефіцієнт перерахунку нітритів у нітрати, який дорівнює відношенню молекулярної маси нітрат-іонів (NO_3^-) до молекулярної маси нітрит-іонів (NO_2^-);

10 000 і 200 – коефіцієнт перерахунку згідно методики.

Лабоарторна робота 1.10. Кількісне визначення нітритів у м'ясних продуктах спектрофотометричним методом.

Принцип методу. Нітрити при взаємодії з гемоглобіном сприяють утворенню метгемоглобіна, який не здатний зворотньо зв'язувати кисень. Це може викликати розвиток гіпоксії.

В основі методу визначення нітритів в м'ясних продуктах лежить кількісна реакція нітрит-іона (NO_2^-) з сульфаніловою кислотою з наступним утворенням при взаємодії з α -нафтиламіном комплексної сполуки, яка має червоно-фіолетове забарвлення.

Метод базується на визначенні нітритів за попередньо побудованим з стандартними розчинами нітритів калібрувальним графіком, де по вісі абсцис відкладають концентрацію нітритів, а по вісі ординат – відповідні їм значення екстинкції (оптичної густини).

Матеріали для дослідження: ковбаси, шинка або інші м'ясні продукти.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; терези аналітичні 2-го класу точності; лабораторний термометр; водяна баня; штатив для пробірок; оцтова кислота (льодова і 12 %-на); хлороформ; розчин цинку сульфату (10 %-й); основний стандартний розчин нітриту, який готують наступним чином: наважку 1,4970 г натрію нітритокислового (NaNO_2) розчиняють в мірній колбі місткістю 1 дм³ в 10-20 см³ дистильованої води і доводять водою до мітки, ретельно

перемішують (1 см³ цього розчину містить 1 мг нітритів); розчин консервують з додаванням 1 см³ хлороформу та зберігають в склянці з темного скла протягом 2-х – 3-х місяців; робочий стандартний розчин готують наступним чином: 1 см³ основного стандартного розчину переносять в мірну колбу місткістю 1 дм³ і доводять об'єм до мітки дистильованою водою, ретельно перемішують (в 1 см³ такого розчину міститься 1 мкг нітритів), використовують свіжеприготовлені розчини; реактив Грісса, який готують наступним чином: 10 г сухого реактива Грісса (містить λ-нафтиламін) розчиняють в 100 см³ 12 %-го розчину оцтової кислоти; дистильована вода; пробірки об'ємом 5 і 10 см³; мірні колби місткістю 50 і 250 см³; градуйовальні піпетки об'ємом 1 – 5 см³; склянка з темного скла місткістю 500 см³; фільтрувальний папір (синя стрічка).

Хід роботи:

Перед початком роботи готують водні витяжки з м'ясних продуктів. Для цього в склянку вносять наважку масою 5 г подрібненого м'ясного продукту (ковбаси, шинки тощо) і додають 30–40 см³ дистильованої води, яка підігріта до 60 °С, ретельно перемішують протягом 10 хв. Потім вміст склянки відстоюють 30 хв щоб над осадом утворилася витяжка з м'ясного продукту.

В подальшому водяну витяжку переносять в мірну колбу місткістю 50 см³ і доводять об'єм до мітки дистильованою водою, причому залишки наважки змивають. Вміст колби ретельно перемішують. Потім в склянку добавляють 20 см³ отриманої водної витяжки, додають 10 см³ розчину калію гідроксиду (або натрію гідроксиду) з молярною концентрацією 0,1 моль/дм³, а також 40 см³ 10 %-го розчину цинку сульфата, все ретельно перемішують. Отриману суміш нагрівають на водяній бані при температурі 60 °С протягом 7 – 8 хв, охолоджують, фільтрують в мірну колбу місткістю 100 см³, додають 4 см³ реактива Грісса, доводять до мітки і перемішують. Дана суміш і є підготовленою пробою для вимірів.

Для побудови калібрувального графіка готують розчини наступним чином: в пронумеровані мірні колби місткістю 50 см³ вносять 0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 і 15,0 см³ робочого стандартного розчину (містить 1 мкг/см³ нітритів). Потім в колби додають приблизно 30 см³ дистильованої води, їх вміст перемішують і в кожну з них додають по 2,0 см³ розчину реактиву Грісса, доводять до мітки і знову перемішують. Отримані розчини містять нітрити в концентрації 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,10; 0,20 і 0,30 мг/см³ відповідно.

Мірні колби з калібрувальними розчинами, і також підготовленою пробою, що досліджується, поміщають у водяну баню, нагрівають до 50 – 60 °С протягом 10 хв, ретельно перемішують, охолоджують і фотометрують при довжині хвилі 520 нм по відношенню до розчину порівняння, який не містить нітритів.

За результатами вимірів екстинкції (оптичної густини) робочих стандартних розчинів нітритів будують калібрувальний графік: по вісі абсцис відкладають концентрацію нітритів в пробах-стандартах (мг/см³), а по вісі ординат – відповідні значення оптичної густини (екстинкції).

Проведення розрахунків:

Масову концентрацію нітритів в досліджуваному продукті обчислюють за формулою:

$$C = (100 \cdot C_2 \cdot 100) / (1\ 000 \cdot m),$$

де C – масова концентрація нітритів в досліджуваному м'ясному продукті, мг/100 г м'ясопродуктах;

C_2 – концентрація нітритів, яка знайдена за калібрувальним графіком (мг/см³);

m – маса наважки м'ясопродукту, яка взята для дослідження (г);

100 і $1\ 000$ – коефіцієнти перерахунку для визначення масової концентрації нітритів в одиницях мг/100 г м'ясопродукту.

Лабораторна робота 1.11. Визначення вмісту сахарози в цукрі поляриметричним методом.

Принцип методу. Сахароза – буряковий або тростинний цукор (α -глюкопіранозил-1,2- β -фруктофуранозид) становить собою дисахарид, який складається із залишків глюкози і фруктози. Розчини сахарози обертають площину поляризації світла вправо на $66,5^\circ$.

Метод визначення сахарози в цукрі базується на вимірюванні кута обертання площини поляризації світла розчином сахарози (цукру) поляриметром (цукрометром) і розрахунку масової частки сахарози ($y\%$).

Матеріали для дослідження: цукор-пісок, цукор-рафінад, цукор-сирець.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: цукрометр (цукрополяриметр) з кварцевим компенсаційним клином або компенсатором, що обертається, з міжнародною цукровою шкалою або автоматичний поляриметр; поляриметричні кювети довжиною 200 мм з накривним склом з прозорого оптичного скла товщиною 1–2 мм із паралельними, рівними поверхнями; контрольна кювета з кварцевими поляриметричними пластинами; терези аналітичні 2-го класу точності та терези лабораторні; ареометр з діапазоном вимірювання густини 1 000 – 2 000 $\text{кг}/\text{м}^3$; термостат; нейзельберова і фарфорова ступки з товкачиком; годинник або секундомір; термометр; водяна баня; скло годинникове вугілля деревне порошкоподібне; етер етиловий; свинцю ацетат; свинцю оксид; алюмінію сульфат; фенолфталеїн; дистильована вода; циліндри мірні місткістю 10, 100 і 1 000 см^3 ; колба мірна місткістю 100 см^3 ; лійка; крапельниця; скляний стакан місткістю 250 см^3 , бутель місткістю 2 дм^3 , палички скляні та дерев'яні; піпетка або шприц місткістю 5 см^3 ; папір фільтрувальний «синя стрічка»; рН-лакмус.

Хід роботи:

Перед проведенням досліджень готують відповідні розчини реактивів:

1. Розчин свинцю ацетату: 300 г свинцю ацетату ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ретельно розтирають у фарфоровій ступці з 100 г свинцю оксиду (PbO) та 100 см^3 дистильованої води; фарфорову ступку з сумішшю вміщують в киплячу водяну баню і нагрівають при перемішуванні до моменту набуття білого або світло-рожевого кольору, який спочатку був жовтим; потім під час премішування додають частинами 900 см^3 горячої ($70 - 80 \text{ }^\circ\text{C}$) дистильованої води і поміщають суміш у бутель, який залишають у теплому ($25 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$) місці на 3 – 5 доби і зрідка перемішують дерев'яною паличкою.

Після освітлення отриманий розчин фільтрують. Розчин повинен мати сильнолужну реакцію на рН-лакмусі і слабколужну на фенолфталеїні. Відфільтрований розчин зберігають у бутлі, закритому корком.

Густина розчину свинцю ацетату при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ повинна бути $\rho_{20}=1\ 235 - 1\ 240 \text{ кг/м}^3$, вміст свинцю в перерахунку на $\text{PbO} - 100 \pm 2 \text{ кг/м}^3$.

2. Розчин алюмінію сульфату (основний): до 122 г алюмінію сульфату (основного) додають $1,0 \text{ дм}^3$ дистильованої води, залишають на одну добу і потім ретельно премішують.

Необхідно також пред початком досліджень перевірити шкалу цукрометра (з компенсатором, що обертається) за допомогою кварцевої пластини з відомим значенням кута обертання площини поляризації (або просто поляризації так званого «цукрового» градусу, $^\circ\text{Z}$). Вимірювання проводять при $20,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ($^\circ\text{Z}_{20}$). Якщо за цієї температури це вимірювання неможливо провести, значення $^\circ\text{Z}$ кварцевої пластини обчислюють за формулою:

$$Z_t = Z_{20} \cdot [1 + 0,00014 \cdot (t - 20)]$$

де Z_t – значення кута обертання площини поляризації кварцевої пластини ($^\circ\text{Z}$) за температури вимірювання $t \text{ }^\circ\text{C}$;

Z_{20} – значення кута обертання площини поляризації кварцевої пластини ($^{\circ}Z$) за температури 20 $^{\circ}C$;

0,00014 – коефіцієнт перерахунку.

В подальшому проводять безпосереднє вимірювання поляризаційним методом вмісту сахарози в пробі, що аналізується. Для цього у нейзільберовій ступці зважують 20 г цукру (цукор-рафінад попередньо подрібнюють у фарфоровій ступці), розчиняють невеликими (20 – 30 cm^3) порціями теплої (30 – 40 $^{\circ}C$) дистильованої води і через лійку переносять у суху мірну колбу місткістю 100 cm^3 . Цукор розчиняють легкими коливанням колби.

При дослідженні цукру-сирцю у розчин в мірній колбі додають краплями розчин (див. вище) свинцю ацетату (не більше 4 cm^3) або основний розчин алюмінію сульфату (до 10 cm^3) до часу, поки не випаде осад.

В подальшому в мірну колбу додають дистильовану воду (ополіскують і шийку колби) у об'ємі, щоби рівень розчину досягнув приблизно 2 см до мітки. Колбу з розчином вміщують на 15 хв. у термостат до досягнення температури $20,0 \pm 0,1$ $^{\circ}C$. Піну, що утворилася на поверхні розчину, видаляють краплею етилового етера, а внутрішні стінки шийки колби до мітки обтирають досуха фільтрувальним папером. Потім розчин в колбі доводять до мітки дистильованою водою при температурі $20,0 \pm 0,1$ $^{\circ}C$ шприцем або піпеткою. Колбу накривають годинниковим склом і витримують 30 хв., закривають корком і ретельно перемішують легким обертанням.

За необхідності розчин фільтрують через подвійний паперовий фільтр при запобіганні випаровування і зміни концентрації розчину. Для цього найпростіше фільтрувальну лійку прикрити пластинкою скла. Перші 10 cm^3 фільтра зливають.

При використанні алюмінію сульфату вміст колби вливають в сухий стакан, додають 2,0 г активованого вугілля, премішують скляною паличкою приблизно 30 с і фільтрують через подвійний паперовий фільтр.

Після отримання фільтрату, ним ополіскують поляриметричну кювету і наповнюють її цим фільтратом так, щоби не утворилися бульбашки повітря. Кювету вміщують в камеру поляриметра (цукрометра), в якій підтримується температура $20,0 \pm 0,1$ °С. Проводять не менше п'яти вимірювань і обчислюють середнє арифметичне значення.

У разі використання автоматичного поляриметра вимірювання проводять згідно «Інструкції по експлуатації» з урахуванням поправок на температуру і об'єм.

Поправку на об'єм визначають наступним чином. Спочатку обчислюють масу розчину m_r (г) без поправки на зважування за формулою:

$$m_r = m_2 - m_1,$$

де m_1 – маса пустої мірної колби, г;

m_2 – маса мірної колби з розчином, г.

Одержаний результат переводять в об'єм за таблицею, яка надається в «Інструкції по експлуатації» цукрометра і за такою таблицею визначають поправку в «цукрових» градусах (°Z).

Наприклад: $m_r = m_2 - m_1 = 109,667$ г; за даними таблиці цьому m_r відповідає $V = 100,010$ см³, а вже цьому V – поправка $+0,10$ °Z.

Кут обертання площини поляризації (або просто поляризацію), скорегований та температуру в «цукрових» градусах обчислюють за формулою:

$$Z_t = \frac{^{\circ}Z - Y}{Q - X} \cdot Q_1 \cdot [1 + 1,44 \cdot 10^{-4} \cdot (t_p - 20)],$$

де Z_t – показання поляриметра ($^{\circ}Z$) розчину цукру, який аналізується, за температури вимірювання t ($^{\circ}C$);

Z – показання поляриметра ($^{\circ}Z$) вразі встановленої поляриметричної кювети з розчином;

Y – показник поляриметра ($^{\circ}Z$) в разі встановленої пустої (без розчину) поляриметричної кювети;

Q – показання поляриметра ($^{\circ}Z$) в разі встановленої кварцевої пластини;

X – показання поляриметра ($^{\circ}Z$) в разі порожнього відділення поляриметричної кювети;

Q_l – поляризаційна здатність (кут обертання площини поляризації) кварцевої пластини в одиницях $^{\circ}Z$, за паспортними даними цієї пластини;

t_p – температура кварцевої пластини ($^{\circ}C$);

20 – температура повітря за нормальних умов ($^{\circ}C$);

$1,44 \cdot 10^{-4}$ – коефіцієнт перерахунку.

Дійсний кут обертання площини поляризації (дійсну поляризацію) обчислюють за формулою:

$$Z_d = Z_t + Z_r,$$

де Z_d – дійсна поляризація ($^{\circ}Z$);

Z_t – поляризація яка скорегована на температуру ($^{\circ}Z$);

Z_r – поправка поляризації на об'єм ($^{\circ}Z$).

Проведення розрахунків:

Масову відсоткову частку сахарози (C , %) обчислюють за формулою:

– у разі використання цукрометрів (поляриметрів) з клинковою компенсацією:

$$C = Z_t \cdot [1 + 0,000611] \cdot (t - 20);$$

– у разі використання цукрометрів (поляриметрів) з компенсатором що обертається:

$$C = Z_t \cdot [1 + 0,000467] \cdot (t - 20),$$

де Z_t – середнє арифметичне значення відліків за шкалою цукрометра (в одиницях $^{\circ}Z$) за температури вимірювання t $^{\circ}C$;

20 – температура повітря за нормальних умов (°C);

0,000611 або 0,000467 – коефіцієнти переахунку.

Масову відсоткову частку у перерахунку на суху речовину сахарози ($C_{с.р.}$, %) обчислюють за формулою:

$$C_{с.р.} = \frac{C \cdot 100}{100 - W},$$

де C – результат вимірювання масової відсоткової частки сахарози (%);

W – масова частка води в цукрі, (%);

100 – коефіцієнт перерахунку.

Лабораторна робота 1.12. Визначення вмісту розчинних сухих речовин за сахарозою в продукції цукрового виробництва рефрактометричним методом.

Принцип методу. Рефрактометрія – це метод аналізу речовин, який базується на вимірі коефіцієнта заломлення світла, який називається ще коефіцієнтом рефракції:

$$n = \frac{\sin \lambda}{\sin \beta},$$

де n – коефіцієнт заломлення світла;

λ і β – кут падіння і заломлення світла, відповідно, при переході променя світла з одного середовища в інше.

Коефіцієнт заломлення світла залежить від різних факторів: природи речовин, температури зовнішнього середовища, довжини хвилі світла і концентрації речовини. Для більшості речовин, в тому числі сахарози, для коефіцієнту заломлення світла характерна пряма залежність.

Коефіцієнт заломлення світла розчином або твердим тілом за використання імерсійної рідини (має таке значення коефіцієнта заломлення, за якого це тіло не впливає на прозорість рідини) вимірюють за допомогою спеціального приладу – рефрактометра згідно «Інструкції по експлуатації», яка надається до кожного типу цих приладів.

В основу роботи деяких типів рефрактометрів покладено метод визначення коефіцієнта заломлення світла речовиною, яка аналізується, по граничному куту заломлення світла або повного внутрішнього відбиття.

На основі закону граничного заломлення:

$$n = n_0 \sin \gamma,$$

де n – коефіцієнт заломлення світла пробою, яка аналізується;

n_0 – коефіцієнт заломлення світла оптичного скла, з якого виготовлена вимірювальна призма;

γ – граничний кут заломлення (повного внутрішнього відбиття).

Основне завдання проведення досліджень продуктів цукрового виробництва – визначення відсотка розчинних сухих речовин по сахарозі (% розчинних сухих речовин). Для цього визначене числове значення коефіцієнту заломлення світла переводять по спеціальним таблицям у відсотках розчинних сухих речовин по сахарозі – в масову частку, тобто кількість по сахарозі. По шкалі переводу цей показник змінюється від 0 ($n^{20} = 1,33299$) до 95 % ($n^{20} = 1,5298$). Масову частку розчинних сухих речовин по сахарозі виражають, як правило, в грамах сахарози на 100 г проби.

Рефрактометричний метод знайшов широке розповсюдження також для визначення чистоти цукру по сахарозі, з чутливістю принаймі до 0,1 %.

Матеріали для дослідження: водний розчин продукту цукрової промисловості, який аналізується.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали:

рефрактометр, еталонні (калібрувальні) проби; дегазована дистильована вода; етиловий спирт; петроленний етер; пробірки об'ємом 10 см³; пастеровська піпетка або мікрошприць; фільтрувальний папір або м'яка серветка.

Хід роботи:

Перед початком роботи вимірювальну камеру з призмами ретельно ополіскують дистильованою водою і сушать, а потім протирають фільтрувальним папером або м'якою серветкою, які змочені сумішшю етиловий спирт : петролейний етер (8:2) і насухо протирають знову фільтрувальним папером або м'якою серветкою.

Юстировку (вивірення точності) рефрактометра проводять перед кожним сеансом вимірювань по дистильованій воді (для неї при $20,0 \pm 0,1$ °C $n^{20}=1,33299$) або по еталонним (калібрувальним) пробам з відомим значенням n . За наявності рефрактометра, у якого є шкала з поділками вмісту сахарози (принаймні до 0,1%), то для юстировки, використовують еталонні проби з відомим вмістом сахарози та ідентичні за наявністю інших речовин проби, яка аналізується.

За наявності в рефрактометрі термостатованої вимірювальної камери температуру в ній виставляють, як і при юстировці по дистильованій воді при $20,0 \pm 0,1$ °C (див. вище). Якщо в рефрактометрі є пристрій для температурної компенсації, то вимірювання можна проводити за іншої, ніж 20 °C температури, але в межах між 10 °C і 30 °C. За відсутності такого пристрою необхідно врахувати поправку на температуру по спеціальним таблицям таким же чином, як для коефіцієнта заломлення світла n , так і для відсоткового вмісту сухих речовин по сахарозі що, як вже відмічалось, зв'язані між собою певними числовими залежностями, які наведені також у спеціальній таблиці. Створені рефрактометри, у яких існує шкала з поділками до 0,1 % сахарози. Тому за їх використання результати аналізу

вмісту розчиненої сухої речовини в пробах визначають одразу, без попереднього користування спеціальними таблицями, в яких приведені числові співвідношення значень коефіцієнта заломлення світла і відсотка розчинених сухих речовин по сахарозі.

При проведенні аналізу обережно, не торкаючись поверхні нижньої призми, на її поверню наносять 2 – 3 краплини розчину, який аналізується. Після з'єднання призм необхідно переконатися, що розчин проби рівномірно покриває поверхню призми. Вимірювання проводять після досягнення цим розчином температурної рівноваги (0,5 – 1 хв.) не менше 3-х разів і вираховують середнє арифметичне значення, яке і є кінцевим результатом вимірів.

Слід зазначити, що вимірювання коефіцієнта заломлення світла (n) прозорих розчинів проводять у прохожому світлі, а в'язких забарвлених або каламутних – у відбитому світлі з використанням спеціальної вимірювальної призми. У випадку нев'язких забарвлених розчинів вимірювання можна проводити як і прохожому, так і відбитому світлі. Це визначається експериментально в залежності від природи речовини, яка аналізується, і чутливості рефрактометра.

Для аналізу в прохожому світлі темних забарвлених цукрових розчинів використовується червоний світлофільтр, який розміщують перед освітлювачем зі сторони камери рефрактометра.

Після закінчення роботи вимірювальну камеру рефрактометра необхідно ретельно промити дистильованою водою та висушити.

Проведення розрахунків:

Визначення масової частки сухих розчинних речовин по сахарозі в продукції цукрової промисловості (в одиницях грам сахарози на 100 г проби, які носять ще назву «Brix») проводять по спеціальним таблицям при співставленні визначеного коефіцієнта заломлення світла зі шкалою зв'язаного з цим коефіцієнтом відсотка сухих речовин з урахуванням, за необхідності,

поправки на температуру. В сучасних рефрактометрах це робиться автоматично за використання спеціальних програм, або вони містять шкалу, поділки якої відповідають принаймні до 0,1 % сахарози. Ці прилади обов'язково містять також пристрій для встановлення температури вимірювальної камери з точністю до 0,5 °С.

Аналогічно визначається масова частка сахарози в розчині цукру.

Лабораторна робота 1.13. Визначення вмісту бензо(а)пірену у продуктах харчування методом спектрофлуориметрії за низької температури.

Принцип методу. Бензо(а)пірен зі зразка харчового продукту, який попередньо обробляють калію гідроксидом, екстрагують гексаном і виділяють методом тонкошарової хроматографії, використовуючи алюмінію оксид. Кількісне визначення в отриманій фракції бензо(а)пірену проводять методом низькотемпературної спектрофлуориметрії.

Матеріали для досліджень: копчене і смажене м'ясо та риба, сухофрукти, які висушені з застосуванням деревного вугілля, тваринні жири, олії.

Устаткування, лабораторний посуд, реактиви та матеріали: спектрофлуориметр з криогенною приставкою для виконання вимірювань за температури рідкого азоту (-196°C) і спектральним діапазоном хвиль від 360 до 420 нм; опромінювач ультрафіолетовий «Хромаскоп» зі спектральним діапазоном від 250 нм до 700 нм та лампою типу БУВ-15, як джерело ультрафіолетового випромінювання; терези лабораторні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г і 500 г; шафа сушильна лабораторна, що забезпечує температуру (250±4)°С, роторний випарювач типу IP-1M, баня водяна, електроплитка побутова із закритою спіраллю та регулятором нагрівання; насос водоструменевий лабораторний; посудина Дьюара для

рідкого азоту будь-якої місткості; камери (ванни) для хроматографування (можливо фотокувети емальовані); пластини скляні розміром 15 см × 30 см та 20 см × 40 см; колби плоскодонні місткістю 100, 250 і 500 см³; колби мірні місткістю 100 см³ з пришліфованим корком; колби круглодонні місткістю 100 см³ і 500 см³; скляні зворотні холодильники типу ХПТ-1-400-14/23 ХС та ХТП-400-29/32 ХС; дефлегматор типу 300-19/26-29/32; алонж типу АЮ-14/23-50; насадка типу Н2-19/23; лійка типу ВФО-32-ПІР 100-160-14/23; лійка ділильна типу ВД-1-500; циліндри мірні місткістю 250 см³; пробірки скляні місткістю 10 см³; пробірки мірні місткістю 10 см³; піпетки місткістю 1, 2,5 і 10 см³; склянки для зважування (бюкси), скляні стандартні капіляри і палички; термометр з межами вимірювання температури від 0 °С до 250 °С, з ціною поділки 1°С; н-гексан, н-октан; спирт етиловий ректифікований технічний; хлороформ; бензол; етер петролейний (фракція від 40 °С до 70 °С), калію гідроксид; алюмінію оксид для хроматографії; аналітичної чистоти бензо(а)пірен та 1,12-бензоперилен; азот рідкий; вода дистильована; тонкий шпатель або скельце від мікроскопа; лінійка з ціною поділки 1 мм.

Хід роботи:

Перед початком аналітичного дослідження проводять певні попередні маніпуляції та готують ряд розчинів.

1. **Очищення розчинників.** Розчинники (н-гексан, н-октан, етиловий спирт, петролейний етер, хлороформ) переганяють загальним способом з дефлегматором.

2. **Готування алюмінію оксиду як адсорбента для ТШХ.** Алюмінію оксид висушують у сушильній шафі за температури 250±4°С протягом 4 год. Речовини зберігають у посудині з пришліфованим корком.

3. **Приготування розчину бензо(а)пірену для ТШХ (розчин "свідка").** Склянку для зважування (бокс) заповнюють до однієї четвертої об'єму бензо(а)піреном, зважують до другого знака. Потім переносять 10 мг бензо(а)пірену у другу склянку (бюксу), наливають туди декілька см³

петролейного етеру до повного розчинення наважки бенз(а)опірену. Склянку із залишком наважки бензо(а)пірену знову зважують. За різницею зважування визначають точну масу взятого бензо(а)пірену. Отриманий розчин бензо(а)пірену, для якого визначали масу, переносять у мірну колбу місткістю 100 см³ з пришліфованим корком і доводять об'єм розчину до мітки петролейним етером. Масова концентрація бензо(а)пірену в отриманому розчині – 100 мкг/см³. Термін зберігання розчину у холодильнику не більше трьох місяців.

4. Приготування основного розчину бензо(а)пірену. Зважують (10,0±0,2) мг бензо(а)пірену, наливають 2-3 см³ до повного розчинення наважки. Отриманий розчин переносять у мірну колбу з пришліфованим корком місткістю 100 см³ і доводять до мітки н-октаном. Масова концентрація бензо(а)пірену в отриманому розчині 100 мкг/см³. Термін придатності розчину не більше трьох місяців при зберіганні в холодильнику.

5. Готування розчину бензо(а)пірену масової концентрації 10 мкг/см³ і робочих розчинів бензо(а)пірену. Розчин бензо(а)пірену масової концентрації 10 мкг/см³ готується з основного розчину цього ПАВ (див. пункт 4). Піпеткою у мірну колбу з пришліфованим корком місткістю 100 см³ вносять 10,0 см³ основного розчину бензо(а)пірену і доводять до мітки н-октаном. Робочі розчини бензо(а)пірену масовою концентрацією 0,1; 0,04; 0,02 і 0,01 мкг/см³ готують у н-октані наступним чином: у мірну колбу з пришліфованим корком місткістю 100 см³ вносять піпеткою об'ємом 1,0; 0,4; 0,2 і 0,1 см³ розчину з масовою концентрацією бензопірен 10 мкг/см³ і доводять до мітки н-октаном. Концентрація приготовлених робочих розчинів відповідно така: 0,1; 0,04; 0,02 і 0,01 мкг/см³. Термін зберігання розчинів у холодильнику – не більше одного місяця.

6. Готування основного розчину 1,12-бензоперилену (внутрішній стандарт). У склянці (бюксі) зважують (10,0±0,2) мг 1,12 - бензоперилену, доливають декілька см³ н-октану до повного розчинення наважки.

Отриманий розчин переносять у мірну колбу з пришліфованим корком місткістю 100 см³ і доводять до мітки н-октаном. В отриманому розчині концентрація 1,12-бензоперилену становить 100 мкг/см³. Термін зберігання розчину у холодильнику – не більше трьох місяців.

7. Готування розчину 1,12-бензоперилену з масовою концентрацією 1,0 мкг/см³ і робочих розчинів (розчин внутрішнього стандарту). Розчин 1,12-бензоперилену з масовою концентрацією 1,0 мкг/см³ готують з основного розчину 1,12-бензоперилену (див. пункт 6). Піпеткою місткістю 1,0 см³ додають в мірну колбу з пришліфованим корком місткістю 100 см³ 1,0 см³ основного розчину 1,12-бензоперилену і доводять до мітки н-октаном. Робочі розчини 1,12-бензоперилену масовою концентрацією 0,01; 0,005; 0,002; 0,001 мкг/см³ в н-октані готують наступним чином: у мірні колби з пришліфованим корком місткістю 100 см³ вносять піпеткою об'єми 1,0; 0,5; 0,2 і 0,1 см³ розчину з масовою концентрацією 1,12-бензоперилену 1,0 мкг/см³ і доводять до мітки н-октаном. Концентрація приготовлених робочих розчинів відповідно така: 0,01; 0,004; 0,002 і 0,001 мкг/см³. Термін зберігання розчинів у холодильнику – не більше одного місяця.

Проведення випробувань

У круглодонну колбу місткістю 500 см³ вміщують наважку харчового продукту масою 25 г (m, г; див. розрахункову формулу масової концентрації), додають 20 см³ дистильованої води, 200 см³ етилового спирту та 20 см³ калію гідроксиду. Вміст колби перемішують на струшувачі, після чого з'єднують зі зворотнім холодильником і кип'ятять на водяній бані 3 години. Потім у колбу через зворотній холодильник додають 150 см³ дистильованої води, колбу знімають з водяної бані та охолоджують до кімнатної температури.

Після охолодження вміст колби переносять у ділильну лійку, залишаючи осад у колбі. До колби з осадом додають 150 см³ н-гексану, вміст колби

енергійно перемішують і верхній шар гексанового екстракту зливають у ділильну лійку. Лійку закривають корком та енергійно струшують. Для розділення емульсії, що утворилася до суміші в ділильній лійці додають 20 см³ етилового спирту та залишають приблизно на 5 хв для розшарування рідин. Після розшарування нижню водно-спиртову фазу зливають у колбу з осадом, а гексановий екстракт переливають у круглодонну колбу місткістю 500 см³. Таку загальну процедуру проводять ще 2 рази, використовуючи для екстракції н-гексан порціями по 100 см³ і етиловий спирт для розшарування емульсії порціями по 20 см³. Отримані екстракти об'єднують.

Після закінчення екстракції осад у колбі та водно-спиртовий розчин відкидають, а зібрані екстракти вміщують у ділильну лійку і тричі промивають дистильованою водою об'ємом 50 см³. Потім упарюють порціями в попередньо зваженій із точністю до другого десяткового знаку круглодонній колбі місткістю 250 см³ на ротаційному випарнику за температури водяної бані не більше 60 °С. Колбу з утвореним екстрактом залишають у витяжній шафі для видалення слідів розчинника, після цього знову зважують та за різницею між зважуваннями визначають масу виділених екстрагованих речовин (m_1 , г).

З колби у бюксу відбирають 1/5 частину екстракту речовин. Потім колбу із залишком екстрагованих речовин зважують і визначають масу залишку екстрагованих речовин (m_2 , г). У бюксу з частиною екстракту додають 0,2 см³ розчину «свідка» бензо(а)пірену (див. пункт 3), після цього вміст бюкси розчиняють у 1–2 см³ петролейного етеру.

Для хроматографічного розділення екстрагованих речовин на скляну пластину розміром 20×40 см рівномірно поміщають змочений петролейним етером алюмінію оксид. Потім за допомогою скляної палички з гумовими кільцями завтовшки 1 мм і шириною 3 мм ретельно розрівнюють шар алюмінію оксиду (за наявності аплікатора краще це робити ним).

На підготовлену пластину скляними капілярами наносять рівномірно суцільною смужкою отримані раніше розчини: на вузьку частину – розчин «свідка» бензо(а)пірену, а на широку – розчин з бюкси, який містить екстраговані речовини з досліджуваного зразка.

Хроматографічну пластину вміщують у попередньо насичену для хроматографії камеру під кутом від 20° до 25° . Після цього в камеру наливають петролейний етер таким шаром на дно камери, щоб він не дійшов до лінії нанесення дослідного екстракту та «свідка» бензо(а)пірену (лінії старту хроматографування). Хроматографічну камеру накривають скляною кришкою і проводять хроматографування до моменту досягнення фронтом розчинника верхнього краю пластини.

Після закінчення хроматографування пластину виймають і не осушуючи її опромінюють ультрафіолетовим світлом. За положенням на пластині смужки (плями) розчину «свідка» бензо(а)пірену визначають місце перебування цієї речовини у дослідному зразку (екстракті). Позначають на пластині простим олівцем чи обережно голкою межі смужки (плями) бензо(а)пірену в дослідному зразку (під ультрафіолетовим опроміненням бензо(а)пірен світиться блакитним кольором). Пластину висушують у витяжній шафі.

Відмічену на хроматографічній пластині смужку алюмінію оксиду, який адсорбував бензо(а)пірен, за допомогою шпателя чи предметного скельця мікроскопа обережно знімають з пластини і переносять на пористу пластину фільтрувальної лійки, яку з'єднують з круглодонною колбою місткістю 100 см^3 роторного випарника. Бензо(а)пірен елюють з алюмінію оксиду бензолом у кількості 50 см^3 , додають бензол невеликими порціями і перемішуючи додають алюмінію оксид на скляному фільтрі лійки скляною паличкою. Після закінчення елювання з колби досуха упарюють бензол на роторному випарнику за температури водяної бані не більше ніж 60°C . Залишок з колби

н-октаном переносять у градуйовану пробірку. Виміряний з точністю до 0,05 см³ об'єм розчину у пробірці (V, см³) повинен бути від 3 см³ до 5 см³.

У отриманому розчині визначають вміст бензо(а)пірену методом добавок або методом внутрішнього стандарту.

Метод добавок. У три пробірки піпеткою вносять 1 см³ розчину бензо(а)пірену в н-октані, отримання якого описано вище. Потім в першу пробірку додають 2 см³ н-октану, у другу – 1,5 см³ н-октану та 0,5 см³ робочого розчину бензо(а)пірену масовою концентрацією 0,1 мкг/см³. У третю – 1,0 см³ н-октану та 1,0 см³ того самого робочого розчину бензо(а)пірену, що і в другу пробірку (розчину масовою концентрацією 0,1 мкг/см³).

Спектрофлуориметричне аналізування починають з третьої пробірки. Для цього її вміщують у посудину Дюара з рідким азотом перед вхідною щілиною спектрофлуориметра. Встановлюють аналітичну лінію флуоресценції бензо(а)пірену 403 нм за довжини хвилі 367 нм. Регулюванням коефіцієнта посилення спектрофлуориметра, шириною щілини потрапляння світла, а також положенням пробірки у посудині Дюара досягають максимального сигналу (за реєструвальним приладом спектрофлуориметра від 50% до 80% можливості). Після цього записують спектрограму бензо(а)пірену в області від 401 нм до 404 нм, фіксуючи значення реєструвального приладу спектрофлуориметра за довжини хвилі 403 нм. Запис спектра повторюють не менше 2-х разів.

Після цього послідовно заморожують у рідкому азоті другу та першу пробірки. Проводять спектрофлуориметричне аналізування подібно тому, яке робили для третьої пробірки.

Масову концентрацію бензо(а)пірену в екстракті харчового продукту (зразку) визначають за калібрувальним графіком, на якому на вісі абсцис відкладають значення маси даного бензо(а)пірену (мкг) у 3-х пробірках; на

вісі ординат – висоту піка максимуму характеристичної лінії бензо(а)пірену при 403 нм, яку вимірюють за отриманими спектрограмами (в мм).

Якщо масова концентрація бензо(а)пірену в дослідному екстракті харчового продукту вище верхньої межі діапазону концентрацій, які вимірюються приладом, та проводять розведення екстракту, що аналізується, н-октаном.

Метод внутрішнього стандарту. В якості внутрішнього стандарту використовують, як правило, 1,12-бензоперилен. У пробірку додають 3 см³ отриманого екстракту харчового продукту і вміщують у посудину Дюара з рідким азотом перед вхідною щілиною спектрофлуориметра, на якому встановлюють аналітичну лінію 403 нм за довжиною хвилі збудження 367 нм і проводять запис спектра екстракту в області довжин хвиль від 401 до 409 нм. За інтенсивністю лінії при порівнянні такої з лініями стандартів оцінюють приблизний вміст бензо(а)пірену у пробі. Після цього в пробірку з 3 см³ екстракту, що містить бензо(а)пірен, додають основний розчин 1,12-бензоперилену (містить 100 мкг/см³ цієї речовини) у такій кількості, щоб у спектрі проби інтенсивність 1,12-бензоперилену за 406,3 нм була у 3–5 разів більше інтенсивності лінії бензо(а)пірену за довжини хвилі 403 нм.

Після цього проводять запис спектру в інтервалі довжин хвиль від 401 нм двічі. Інтенсивності характеристичних ліній бензо(а)пірену за 403 нм і 1,12-бензоперилену за 406,3 нм (H_1 і H_2 відповідно) визначають за спектрограмами, вимірюючи висоти піків максимальних характеристичних ліній цих сполук (у міліметрах). За результат беруть середнє арифметичне двох визначень для кожної сполуки. Розраховують коефіцієнт (K) відношення інтенсивності спектральної лінії (за її висотою) бензо(а)пірену (H_1) до інтенсивності спектральної лінії 1,12-бензоперилену (H_2): $K = H_1/H_2$.

Далі визначають цей коефіцієнт робочих (стандартних) розчинів (зокрема 0,04; 0,02 мкг/см³) бензо(а)пірену ($K_{см}$). Для цього у дві пробірки наливають по 3 см³ робочих розчинів 0,04 і 0,02 мкг/см³. У кожен з пробірок

добавляють таку саму кількість основного розчину (100 мкг/см^3) 1,12-бензоперилену. Проводять двічі запис спектрів кожного розчину пробірок в інтервалі довжин хвиль від 401 нм до 409 нм. За спектрограмами визначають інтенсивність характеристичних ліній бензо(а)пірену за 403 нм і 1,12-бензоперилену за 406,3 нм (H_{1cm} і H_{2cm} , відповідно). За результат беруть середнє арифметичне двох визначень за кожною концентрацією. Розраховують: $K_{cm} = H_{1cm} / H_{2cm}$.

Визначені значення K і K_{cm} використовують для розрахунку масової концентрації бензо(а)пірену цим методом.

Проведення розрахунків:

За використання методу добавок визначення масової концентрації бензо(а)пірену у дослідному зразку (P , мкг/кг) харчового продукту розраховують за формулою:

$$P = \frac{c \cdot V \cdot m_1}{m_2 \cdot m} \cdot 10^{-3},$$

де c – концентрація бензо(а)пірену в пробі (екстракті), яка визначена методом добавок за калібрувальним графіком, мкг/см³;

V – об'єм розчину (екстракту) бензо(а)пірену, який виділено з наважки харчового продукту см³;

m – маса наважки харчового продукту, г;

m_1 – маса екстракту який отриманий з наважки харчового продукту, г;

m_2 – маса екстракту нанесеного на хроматографічну пластинку, г;

10^{-3} – коефіцієнт для переведення грам (г) в кілограми (кг).

За використання методу внутрішнього стандарту масову концентрацію бензо(а)пірену в досліджуваному об'ємі екстракту з харчового продукту (P , мкг/см³) обчислюється за формулою:

$$P = P_{ст} \cdot K / K_{ст},$$

де $P_{ст}$ – концентрація бензо(а)пірену в його коефіцієнта відношення $K_{ст}$ (див. нижче), мкг/см³;

$K_{ст}$ – коефіцієнт відношення, який визначений для стандартних (робочих) розчинів бензо(а)пірену і 1,12-бензоперилену: $K_{ст} = H_{1ст} / H_2$, де $H_{1ст}$ – інтенсивність спектральної лінії бензо(а)пірену за стандартної його концентрації (в робочому розчині – 0,02 мкг/см³ або 0,004 мкг/см³, див. вище), вимірюється в міліметрах на спектрограмі; H_2 – інтенсивність спектральної лінії обраного робочого розчину 1,12-бензоперилену, яка близька до $H_{1ст}$; K – коефіцієнт відношення, який визначений для розчину екстракту, що містить бензо(а)пірен, та для обраної концентрації 1,12-бензоперилену: $K = H_1 / H_2$, де H_1 – інтенсивність спектральної лінії бензо(а)пірену в екстракті наважки харчового продукту (вимірюється у міліметрах на спектрограмі); H_2 – інтенсивність спектральної лінії 1,12-бензоперилену, який доданий до екстракту наважки харчового продукту.

Для визначення методом внутрішнього стандарту масової концентрації бензо(а)пірену у дослідному харчовому продукті в мкг/кг необхідно враховувати, як це зроблено за використанням методу добавок (див. вище), масу зразка (m), масу отриманого екстракту для досліду (m_1), масу нанесеного екстракту на колонку хроматографа (m_2) та об'єм екстракту, який отриманий з наважки харчового продукту (V).

Лабораторна робота 1.14. Визначення вмісту бензо(а)пірену у продуктах харчування методом спектрофлуориметрії за кімнатної температури.

Принцип методу. Із зразка харчового продукту, який попередньо оброблений калію гідроксидом, гексаном екстрагують фракцію, що містить бензо(а)пірен. Її очищають від супутніх домішок на колонці з сефадексом і в

тонкому шарі ацетильованої целюлози, з наступним кількісним визначенням виділеного бензо(а)пірену спектрофлуориметрією за кімнатної температури.

Матеріали для дослідження: копчене і смажене м'ясо та риба, сухофрукти, які приготовлені зі застосуванням деревного вугілля, тваринні жири, олії.

Устаткування, лабораторний посуд, реактиви та матеріали: спектрофлуориметр із спектральним діапазоном хвиль від 300 нм до 460 нм з кюветами місткістю 0,4 см³; колонка скляна хроматографічна довжиною 50 см і діаметром 2 см, з відтягнутим знизу кінцем і резервуаром місткістю до 60 см³; ваги лабораторні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г і 500 г; роторний випарник типу IP-1M, газопродувка, насос водоструйний; баня водяна; магнітна мішалка типу ММ-3М з електропідігрівом; випромінювач ультрафіолетовий типу «Хромоскоп» зі спектральним діапазоном від 250 нм до 700 нм і лампою типу БУВ-15 як джерело ультрафіолетового випромінювання; камера хроматографічна скляна для хроматографування (розміром 10 см × 40 см × 40 см); пластинки скляні для тонкошарової хроматографії (розміром 5 см × 20 см і 20 см × 20 см); колби плоскодонні місткістю 25, 100, 500 і 1000 см³; колби круглодонні місткістю 50, 200 і 500 см³; колби мірні з пришліфованим корком місткістю 100 см³; скляний зворотній холодильник типу ХПП-2-400-29/32 ХС; алонж типу Н2-19/26-14/23 ТС; лійка ділильна типу ВД-1-500; лійка типу ВФО-32-ПП100-14/23 ХС; лійка Бюхнера; циліндри місткістю 250 см³; склянка місткістю 100 см³; склянки (бюкси) для зважування типу СВ-14/3; мікрошприц типу МШ-10; скляні стандартні капіляри, піпетки типу 1-1-1, 1-1-2, 2-1-5 і 8-2-0,2; н-гексан; бензол; толуол; ацетон; спирт етиловий ректифікований; кислота сульфурова (сірчана); ангідрит оцтовий, диметилфермаїд; ацетонітрил; калію гідроксид; целюлоза мікрокристалічна порошкова; сефадекс LH-20; силікагель марки АСКГ; безводний натрію сульфат; аналітичної чистоти бензо(а)пірен; вода дистильована; папір

індикаторний універсальний; папір фільтрувальний лабораторний; скальпель або тонкий шпатель; лінійка вимірювальна з ціною поділки 1 мм.

Хід роботи:

Перед початком аналітичних досліджень проводять певні попередні операції та готують ряд розчинів.

1. Очищення розчинників. Розчинники (н-гексан, бензол, ацетон, етиловий спирт) переганяють загальноприйнятим способом з дефлегматором.

Диметилформамід переганяють, додавши в колбу для перегонки місткістю 500 см³ 120 см³ бензолу і 36 см³ дистильованої води на 1 дм³ розчинника.

2. Підготування ацетильованої целюлози. У плоскодонну колбу місткістю 500 см³ вміщують (50,0 ± 2,0) г мікроскопічної порошкової целюлози, додають приготовлену в окремій колбі суміш 150 см³ бензолу або толуолу, 70 см³ оцтового ангідриду і 0,3 см³ сульфурової (сірчаної) кислоти. Реакційну суміш перемішують магнітною мішалкою протягом 6–8 годин і залишають на 18 годин без перемішування. Після цього декантують рідку фазу, а залишок заливають 300 см³ етилового спирту, перемішують і залишають у спирті на 24 години. Потім целюлозу відфільтровують на лійці Бюхнера, промивають 100 см³ етилового спирту і дистильованою водою доводять до нейтральної реакції промивних вод (за індикаторним папером).

3. Перевірка хроматографічної активності ацетильованої целюлози. Для перевірки хроматографічної активності ацетильованої целюлози за 3–4 год до аналізування готують суміш етилового спирту, ацетону і дистильованої води, взятих в об'ємному співвідношенні 60:25:15 і вливають її у хроматографічну камеру, яка вистелена смужками фільтрувального паперу. Висота шару такої суміші (розчинника) в хроматографічній камері повинна становити від 1,5 до 2 см. На скляну пластину розміром 5 см × 20 см на відстані 2 см від нижнього краю простим олівцем наносять стартову лінію. На пластинку виливають рівним шаром

суспензію, яка складається з 1,5 г ацетильованої целюлози і 7 см³ етилового спирту. Дають розчиннику повністю випаруватись на повітрі. На стартову лінію мікрошприцем або скляним капіляром наносять 10 см³ робочого розчину бензо(а)пірену масової концентрації 1 мкг/см³ приготовленого згідно п.6. Пластину вміщують у хроматографічну камеру і залишають у ній доти, поки рівень розчинника (його фронт) підніметься не менше ніж на 10 см від лінії старту. Після закінчення хроматографування пластину виймають, висушують на повітрі і під лампою ультрафіолетового опромінювача позначають простим олівцем флуоресцювальну блакитним капіляром пляму бензо(а)пірену. Вимірюють відстань від стартової лінії до фронту розчинника і від стартової лінії до середини плями бензо(а)пірену; розраховують коефіцієнт рухомості R_f за формулою.

$$R_f = \frac{L_{БП}}{L},$$

де $L_{БП}$ – відстань від стартової лінії і до середини плями бензо(а)пірену, мм;

L – відстань від стартової лінії до фронту розчинника, мм.

Значення коефіцієнту рухомості R_f бензо(а)пірену повинна становити не менше ніж 0,1, що свідчить про можливість повного розділення цієї речовини.

Якщо отримане значення коефіцієнта рухомості R_f менше ніж 0,1, то випробування необхідно повторити спочатку.

4. Готування робочої хроматографічної частини ацетильованої целюлози. Для готування хроматографічної частини 5 г ацетильованої целюлози, приготовленої згідно пункту 2, суспендують у 20 см³ етилового спирту і виливають рівним шаром на робочу частину 20 см × 20 см (краще це робити з використанням аплікатора).

5. Готування основного розчину бензо(а)пірену. У склянку для зважування (бюксу) додають 10, ±0,2 мг бензо(а)пірену. Наважку переносять у мірну колбу місткістю 100 см³ і доводять бензолом до мітки. Отриманий

розчин має масову концентрацію 100 мкг/см^3 . Термін зберігання розчину в холодильнику – не більше 3-х місяців.

6. Готування робочого розчину бензо(а)пірену. Робочий розчин бензо(а)пірену масової концентрації 1 мкг/см^3 готують наступним чином: з основного розчину (100 мкг/см^3) відбирають піпеткою $1,0 \text{ см}^3$ і переносять у мірну колбу місткістю 100 см^3 , об'єм розчину доводять до мітки бензолом. Термін зберігання в холодильнику – не більше 1-го місяця.

Проведення випробування

У плоскодонну колбу місткістю 100 см^3 вміщують наважку харчового продукту масою 10 г , додають розчин, що складається з 4 г калію гідроксиду в 50 см^3 92%-го етилового спирту. Вміст колби перемішують струшуванням. Колбу з'єднують зі зворотнім холодильником і нагрівають на водяній бані 3 год за кипіння реакційної суміші.

Потім у колбу додають через зворотній холодильник 100 см^3 дистильованої води, знімають з водяної бані та охолоджують до кімнатної температури. Після охолодження реакційну масу переносять у ділильну лійку місткістю 500 см^3 . Якщо в реакційній суміші залишився твердий осад, його відділяють на лійці Бюхнера, промиваючи цей залишок на фільтрі гарячим етиловим спиртом (температура $50 \text{ }^\circ\text{C}$ – $60 \text{ }^\circ\text{C}$) об'ємом 30 см^3 .

Рідку фазу реакційної маси використовують для екстракції бензо(а)пірену переносять у ділильну лійку, в яку додають ще 30 см^3 н-гексану. Вміст лійки струшують. У разі утворення емульсії до суміші в ділильній лійці до неї додають 20 см^3 етилового спирту. Після розшарування суміші нижню водно-спиртову фазу зливають у колбу місткістю 500 см^3 , а гексановий екстракт переливають в іншу ділильну лійку. Таку процедуру проводять двічі, використовуючи для екстракції н-гексан по 30 см^3 та етиловий спирт для розшарування емульсії порціями по 20 см^3 .

Після закінчення екстракції об'єднаний гексановий екстракт промивають у ділильній лійці дистильованою водою тричі порціями по 30

см³. Верхній гексановий шар екстракту переносять у колбу місткістю 500 см³, а нижній водний шар відкидають. Гексановий екстракт фільтрують крізь шар безводного натрію сульфату на лійці з пористим фільтром у круглодонну колбу місткістю 500 см³. Гексановий екстракт упарюють на ротаційному випарнику до об'єму 50 см³ за температури водяної бані не вище ніж 60 °С.

Упарений гексановий екстракт переносять у ділильну лійку місткістю 500 см³ і додають до нього 50 см³ суміші з диметилформаміду і дистильованої води, які взяті в об'ємному співвідношенні 9:1. Інтенсивно струшують суміш протягом 1 хв і дають відстоятись. Після розшарування фаз нижній шар зливають у плоскодонну колбу місткістю 200 см³, а з верхнього гексанового шару знову проводять екстракцію бензо(а)пірену сумішшю диметилформаміду і дистильованої води (9:1) об'ємом 50 см³. Отриману суміш знову струшують 1 хв і дають відстоятись. Після розділення фаз верхній гексановий шар відкидають, а об'єднаний у плоскодонній колбі диметилформамідний екстракт (нижній шар) переносять у ділильну лійку, додають 100 см³ дистильованої води і проводять екстракцію бензо(а)пірену з водної фази гексаном трічі порціями по 50 см³. Диметилформамідну фазу відкидають, а гексановий екстракт промивають дистильованою водою трічі порціями по 30 см³. Переносять у плоскодонну колбу місткістю 500 см³ і додають 10 г безводного натрію сульфату та витримують протягом 1 год. Після відстоювання гексановий екстракт випарюють на ротаційному випарнику до об'єму 2 см³, розчинник видаляють потоком повітря через вакуумний алонж, який з'єднаний із водоструйним насосом. Осад у колбі, що лишився після упарювання, розчиняють у 0,5 см³ етилового спирту.

У склянку місткістю 100 см³ зважують (2,5±0,2) г сефадекса LH-20, додають 20 см³ етилового спирту і залишають набрякати 3-4 год. Потім отриманий гель переносять, змиваючи невеликою кількістю етилового спирту у скляну хроматографічну колонку. Дають розчину стекти таким чином щоб шар етилового спирту над шаром гелю залишився не нижче ніж 2

мм. На підготовлену колонку наносять етанольний розчин осаду з колби ротаційного випарника, тричі ополіскуючи колбу етиловим спиртом по 0,5 см³, і ці розчини так само наносимо на колонку.

Елюювання з колонки речовин, зокрема бензо(а)пірену проводять 40 см³ етилового спирту. Першу фракцію елюату об'ємом 12 см³ відкидають, збирають другу фракцію об'ємом 25 см³. Швидкість елюювання розчинника – 0,5 см³/хв. Її забезпечують створюючи невеликий надмірний тиск потоком повітря чи азоту у газіваному стані через насадку, яка з'єднана з газопродувкою або газовим балоном. Газ необхідно подавати через скляну трубку, що заповнена силікагелем.

Колонку з сефадексом LH-20 можна використовувати багато разів. Для цього, не допускаючи висихання сорбенту після фракціонування, колонку промивають 25 см³ етилового спирту і наносять наступну порцію досліджуваного етанольного розчину.

Розчин другої фракції елюату з колонки переносять у круглодонну колбу місткістю 50 см³, розчинник упарюють до об'єму 1,0 см³ на ротаційному випарнику. Його залишок видаляють в потоці повітря або азоту в газовому стані. Отриману фракцію, яка містить бензо(а)пірен, аналізують спектрофлуориметричним методом.

Одночасно проводять так званий «сліпий» дослід за використання всіх стадій аналізу із застосуванням усіх реактивів, але без наважки харчового продукту.

Визначення вмісту бензо(а)пірену спектрофлуориметричним методом за кімнатної температури у навазці харчового продукту проводять одночасно з контрольним дослідом, зразок якого («свідок») містить 50 мм³ робочого розчину бензопірену з вмістом цієї речовини 1 мкг/см³.

Отриману фракцію з колонки, що містить виділений з наважки харчового продукту бензо(а)пірен і контрольну пробу з цим поліциклічним

ароматичним вуглеводнем концентрацією 1 мкг/см^3 , розчиняють у $0,5 \text{ см}^3$ бензолу.

Дослідний зразок екстракту з наважки харчового продукту після очищення на хроматографічній колонці додатково очищують хроматографією в тонкому шарі ацетильованої целюлози.

Хроматографічну пластинку розміром $20 \text{ см} \times 20 \text{ см}$ з шаром ацетильованої целюлози (готування див. пункт 4) ділять на 2 поля: бокове – завширшки 2 см і основне, проводячи по шару адсорбенту (ацетильованої целюлози) скальпелем або тонким шпателем розділювальну смугу. На основне (широке) поле суцільною смужкою, відступивши 2 см від нижнього краю пластинки і по 1 см з бічних країв, на стартову лінію наносять розчин фракції. Він містить бензо(а)пірен, який екстрагований з наважки харчового продукту й очищений на колонці. Розчин наносять за допомогою тонкого відтягнутого капіляру або мікрошприцем. Розмір плям не повинен перевищувати 5 мм . На стартову лінію вузького поля наносять 10 мм^3 робочого розчину бензо(а)пірену (тест-стандарту), який містить 1 мкг/см^3 цієї речовини (див. пункт 6). Після повного випарювання розчинника пластину вміщують у попередньо насичену хроматографічну камеру під кутом $20^\circ\text{--}25^\circ$. Проводять хроматографування у суміші елюента, яка містить етиловий спирт, ацетон і дистильовану воду в об'ємному співвідношенні $60:25:15$. Коли фронт розчинника досягне верхнього краю платини, її виймають з камери, висушують на повітрі та виявляють хроматографічну зону бензо(а)пірену при освітленні лампою ультрафіолетового випромінювача. Бензо(а)пірен у цьому випадку світиться блакитним кольором.

За положенням на пластинці плями (смуги) розчину «свідка» (контрольного зразка бензо(а)пірену) визначають місце перебування бензо(а)пірену у дослідному зразку.

Адсорбент із зони вмісту бензо(а)пірену з основного поля (містить дослідний зразок) за допомогою скальпеля чи тонкого шпателя зішкрябають з

пластини і переносять на скляний фільтр лійки, з якого речовину (бензо(а)пірен) елюють у кілька прийомів 50 см³ бензолу у круглодонну колбу місткістю 100 см³. Після цього розчинник випарюють на ротаційному випарнику до об'єму 1,0–1,5 см³, залишок розчинника видаляють потоком повітря або азоту у газовому стані та додають у колбу 1 см³ бензолу.

Далі на спектрофлуориметрі за довжини хвилі збудженого світла 367 нм у діапазоні від 400 нм до 440 нм зі швидкістю сканування 60 нм/хв записують спектрофлуорисценцію дослідного зразка і тест-стандарту, яким є робочий розчин бензо(а)пірену, що містить концентрацію цієї речовини 1 мкг/см³. Для кожного зразка спектр записують двічі, домагаючись достатньої відтворюваності. На отриманих спектрограмах у максимумі флуорисценції бензо(а)пірену 403 нм вимірюють у мм висоту спектральної лінії бензо(а)пірену для дослідного і контрольного зразків. Розраховують середнє значення висот піків бензо(а)пірену за даними двох спектрограм. За високого вмісту бензо(а)пірену в дослідному зразку його розводять бензолом і знову записують спектр флуорисценції у тому ж режимі, що і для контрольного.

Проведення розрахунків

Масова концентрація бензо(а)пірену в дослідному зразку (P , мкг/кг) обчислюють за формулою:

$$P = \frac{C_{ст.} \times H \times V_{ст.}}{m \times H_{ст.}} \times 10^{-3}$$

де $C_{ст.}$ – масова концентрація бензо(а)пірену в тест-стандартному зразку, мкг/см³;

$H_{ст.}$ – висота спектральної лінії бензо(а)пірену на спектрограмі тест-стандарту, мм;

H – висота спектральної лінії бензо(а)пірену на спектрограмі дослідного зразку, мм;

$V_{ст.}$ – об'єм розчину тест-стандарту, см³;

m – маса наважки харчового продукту, взятого для дослідження, г;

10^{-3} – коефіцієнт переведення грам (г) в кілограм (кг).

Замість значення висот, за можливості визначення, можна використати площі піків (мм²).

Лабораторна робота 1.15. Визначення Плюмбуму, Купруму і Цинку за характерними для кожного хімічного елемента реакціями.

Принцип методу. Відділення Плюмбуму, Купруму і Цинку від інших хімічних елементів ґрунтується на осадженні даних хімічних елементів у вигляді сульфатів і подальшому їх розділенні та визначення вмісту в зразках за допомогою характерних для кожного хімічного елемента реакцій.

Матеріали для дослідження: вода, рідкі харчові продукти (молоко, плодово-ягідні соки), стандартизовані екстракти (витяжки) ґрунту, органів і тканин рослин та тварин, в тому числі харчових продуктів.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр, терези аналітичні 2-го класу точності, муфельна піч (до температури 450°C), водяна і піщана бані, настільна центрифуга з швидкістю обертання ротора не менше 1000 об./хв., газовий пальник, порцелянові чашки і тиглі, предметні скельця мікроскопу; аміак (10% і 20%), феруму сульфід, натрію гідроксид (10%), пергідроль, етиловий спирт (96%), натрію ацетат (насичений розчин, підкислений оцтовою кислотою до слабокислої реакції за лакмусом), кислоти: нітратна (азотна), сульфатна (сірчана) і оцтова – концентровані, хлороводнева (соляна) – 1%-ва і 10%-ва, калій двохромокислий – 5%-вий, 10%-вий розчин соди (Na_2CO_3), 20%-вий розчин калію меркурій-роданідного, 1%-вий розчин фенолфталеїну, сірководень, дистильована вода; пробірки хімічні та центрифужні на 10 см³, мірні циліндри на 10 см³, хімічні стакани на 50 см³, плоскодонна колба на 100 см³, мірні циліндри на 10 см³, штатив для пробірок, фільтрувальний папір.

Хід роботи:

Перед проведенням досліджень проводять підготовку зразка до цієї процедури: 200 см³ досліджуваного зразка випарюють невеликими порціями у порцеляновій чашці (діаметр близько 7 см) на водяній бані досуха, висушують на піщаній бані, а потім обережно обвуглюють і озоляють на

слабкому вогні або в муфельній пічці (спочатку з відкритими дверцятами при розташуванні порцелянової чашки у самих дверей муфельної пічки; після обуглення речовини в чашці її (чашку) переставляють у глибину муфельної пічки і закривають дверцята, допускаючи слабо-червоне розжарювання стінок муфельної пічки).

Після озолення і охолодження порцелянової чашки до золи додають 5 см³ розбавленою дистильованою водою (1:1) 10%-вої хлороводневої кислоти і 1 краплю пергідролу та випарюють на водяній бані досуха. Сухий залишок обробляють 2 см³ 10%-вої хлороводневої кислоти, додають 3 см³ дистильованої води і фільтрують крізь заздалегідь змочений фільтрувальний папір у колбу на 100 см³. Порцелянову чашку і фільтр промивають 15 см³ дистильованої води, зливаючи промивні води в ту ж колбу.

Виділення і наступне розділення Плюмбуму, Купруму і Цинку.

Отриманий розчин з хлороводневою кислотою озолоного зразка нагрівають в полум'ї газового пальника до 40 – 50°C і протягом 40 – 60 хв пропускають крізь нього струмінь сірководню за допомоги вузької відтягнутої трубки, яка досягне до дна колби. При цьому осаджуються сульфати Плюмбуму, Купруму, Цинку та деяких хімічних елементів, зокрема, Стануму.

Добутий з колби осад сульфатів відділяють центрифугуванням при швидкості обертання ротора центрифуги 1 тис. об./хв у центрифужній пробірці на 10 см³ і збирають надосадову рідину в порцелянову чашку (це так званий *розчин А*, в якому може бути Цинк).

Отриманий осад промивають 1 – 2 рази 2 см³ 1%-вою хлороводневою кислотою і об'єднують промивну рідину з раніше отриманим розчином А.

До промитого осаду сульфатів додають 5 крапель 10%-го розчину натрію гідроксиду, нагрівають на киплячій водяній бані та розбавляють 10 см³ дистильованої води.

Отриманий розчин центрифугують при швидкості обертання ротора центрифуги 1 тис. об./хв. У центрифужній пробірці в надосадовій рідині

може бути Станум, а в осаді – сульфати Плюмбуму і Купруму, а також Сульфур.

До осаду, який містить сульфати Плюмбуму і Купруму, додають 5 – 10 крапель суміші концентрованих сульфатної і нітратної кислот (1:1) та нагрівають на невеликому полум'ї газового пальника, обережно періодично помішуючи до дна пробірки. Нагрівання та перемішування осаду сульфатів Плюмбуму і Купруму з сумішшю сульфатної та нітратної кислот завершують після закінчення виділення парів нітратної кислоти і появи білого кольору парів оксиду сульфату (VI).

Після охолодження в пробірку додають 0,5 – 1,0 см³ дистильованої води і таку ж кількість 96%-го етилового спирту. Поява в розчині каламуті або білого осаду свідчить про наявність плюмбуму сульфату. У цьому випадку проводять наступні операції:

1. Осад плюмбуму сульфату відділяють центрифугуванням при швидкості обертання ротора центрифуги 1 тис. об./хв, а надосадовий розчин збирають в порцелянову чашку.

Осад промивають 1 – 3 рази 10 см³ розбавленого дистильованою водою (1:1) 96%-вим етанолом, приєднуючи промивні розчини з надосадовим розчином у порцеляновій чашці (отримують розчин, з якого готують пробу для кількісного визначення Купруму).

Для одержання проби, в якій визначають Купрум, отриманий розчин випаровують досуха на водяній бані, охолоджують і додають 1 – 5 крапель 25%-го розчину аміаку. Поява навіть слабкого блакитного забарвлення свідчить про наявність у взятому зразку Купруму. Для інтенсивного забарвлення додають 1 – 2 см³ дистильованої води і, якщо розчин стає каламутним, ще 1 – 5 крапель 25%-го розчину аміаку. Осад відділяють центрифугуванням при швидкості обертання ротора центрифуги 1 тис. об./хв. Надосадовий розчин зливають у мірний циліндр на 10 см³. Осад у центрифужній пробірці промивають 1 – 2 рази 2 см³ сумішшю дистильованої

води і 1%-го розчину аміаку (1:1), приєднуючи промивний розчин до розчину в мірному циліндрі і об'єм в ньому доводять до мітки (10 см³) дистильованою водою. Отриманий розчин (це так званий **розчин Б**) використовується для визначення в досліджуваному зразку Купруму.

2. До осаду плюмбуму сульфату, який залишився в центрифужній пробірці, додають 1 см³ насиченого розчину натрію ацетату, що слабо підкислений оцтовою кислотою, та нагрівають в киплячій водяній бані 5 – 10 хв, додають 1 см³ дистильованої води і фільтрують через заздалегідь змочений дистильованою водою фільтр в мірний циліндр місткістю 10 см³. Пробірку і фільтр промивають 2 – 3 рази невеликими порціями (приблизно по 2 см³) дистильованої води і зливають промивні води в той же мірний циліндр, де його об'єм доводять дистильованою водою до мітки (10 см³). Отримують так званий **розчин В**. Наявність в ньому Плюмбуму перевіряють наступним чином: з мірного циліндру 5 см³ розчину переносять в пробірку, додають 3 краплі 5%-го калію двохромовокислого і перемішують. Якщо розчин залишається 10 хв прозорим, то вважається, що в ньому Плюмбум відсутній. Якщо ж розчин стає каламутним (за рахунок утворення PbCrO₄), то він використовується для визначення вмісту Плюмбуму.

Визначення Плюмбуму

Для кількісного визначення Плюмбуму 1 см³ **розчину В** з циліндру переносять в мірну пробірку місткістю 10 см³, а в три такі ж пробірки вносять по 1 см³ тест-стандартного розчину Плюмбуму з його кількістю 0,01; 0,015 і 0,02 мг. У пробірки з тест-стандартними розчинами Плюмбуму додають по 0,1 см³ насиченого розчину натрію ацетату, який слабо підкислений оцтовою кислотою, а в пробірку з розчином В – 0,1 см³ дистильованої води (до нього вже попередньо додали натрію ацетат, який слабо підкислений оцтовою кислотою, див. вище). Потім у пробірку з розчином В та пробірки з тест-стандартами додають по 3 краплі 5%-го калію двохромовокислого, ретельно перемішують і через 10 – 15 хв. утворену

каламуть у пробірці з досліджуваним зразком (розчин В) порівнюють з такою ж у тест-стандартних розчинах. Це роблять візуально, підбираючи тест-стандартний розчин з найбільш наближеною каламуттю до досліджуваного зразка. Потім за допомогою фотоколориметра або спектрофотометра визначають світлопропускання досліджуваного зразка і підбраного тест-стандарту (див. нижче).

Проведення розрахунків:

За використання колориметра або спектрофотометра, як відмічалось, роблять порівняння показника світлопропускання у видимій області спектра для найбільш наближених по каламутності тест-стандарту і досліджуваного зразка при одній довжині хвилі (530 нм). Визначення показника світлопропускання проводять негайно після струшування проб. Концентрацію Плюмбуму в досліджуваному зразку визначають за формулою:

$$X_{Pb} = \frac{k \cdot C \cdot V_1 \cdot 1000}{V_2 \cdot V_3},$$

де X_{Pb} – концентрація Плюмбуму в досліджуваному зразку, мг/дм³;

k – коефіцієнт відповідності світлопропускання досліджуваного зразка підбраному тест-стандарту, який дорівнює $k = T_1/T_2$, де T_1 – світлопропускання досліджуваного зразку, T_2 – світлопропускання підбраного тест-стандарту;

C – кількість Плюмбуму в підбраному тест-стандарті;

V_1 – об'єм всього досліджуваного зразку (10 см³), з якого взято об'єм V_2 (2 см³);

V_3 – загальний об'єм взятого для дослідження рідкого зразку (200 см³);

1000 – коефіцієнт перерахунку см³ на дм³.

Визначення Купруму

Розчин Б (див. вище) в об'ємі 7 см³ переносять у мірну пробірку місткістю 10 см³. В інші три пробірки вносять у такому ж об'ємі (7 см³) тест-стандартні розчини Купруму, які містять, відповідно, 0,1; 0,3 і 0,5 мг Купруму. Потім у всі чотири пробірки додають по 2 см³ 25%-го розчину

аміаку і дистильованою водою доводять об'єм кожної пробірки до 10 см³ та перемішують.

В подальшому реєструють за використання колориметра або спектрофотометра інтенсивність забарвлення досліджуваного зразка і підбраного за схожістю тест-стандарту при довжині хвилі 480 нм.

Проведення розрахунків:

Концентрацію Купруму в досліджуваному зразку обчислюють за формулою:

$$X_{Cu} = \frac{K \cdot C \cdot V_1 \cdot 1000}{V_2 \cdot V_3},$$

де X_{Cu} – концентрація Купруму в досліджуваному зразку, мг/дм³;

K – коефіцієнт відповідності інтенсивності забарвлення досліджуваного зразка підбраному тест-стандарту, який дорівнює: $K = E_1/E_2$, де E_1 – інтенсивність забарвлення досліджуваного зразку, E_2 – інтенсивність забарвлення підбраного тест-стандарту;

C – кількість Купруму в підбраному тест-стандарті;

V_1 – об'єм розчину (Б), приготовленого для визначення Купруму (7 см³);

V_2 – об'єм досліджуваного розчину, взятого для визначення інтенсивності забарвлення (10 см³);

V_3 – загальний об'єм взятого для дослідження рідкого зразку (200 см³);

1000 – коефіцієнт перерахунку см³ на дм³.

Визначення Цинку

До отриманого (див. вище) додають 5 – 7 крапель пергідролі, випарюють на водяній бані досуха. До залишку додають 2 – 3 см³ 10%-го розчину хлорводневої кислоти і нейтралізують отриманий розчин 10%-вим розчином соди (Na₂CO₃) до утворення білої каламуті (осаджуються карбонати ряду хімічних елементів – Феруму, Кальцію та ін., у тому числі Цинку). Для їх розчинення додають краплинами 10%-вий розчин хлорводневої кислоти до утворення прозорого розчину.

До цього прозорого розчину додають 5 – 7 см³ насиченого розчину натрію ацетату, який слабо підкислений оцтовою кислотою. Утворену суміш нагрівають до кипіння, щоб осадити Ферум. Кип'ятять цю суміш 1 – 2 хв, а потім гарячий розчин миттєво фільтрують в колбу. Осад на фільтрі тричі промивають гарячим розведеним розчином натрію ацетату (1:20) і зливають у колбу з фільтратом. Фільтр повинен незабарвлюватися. У іншому випадку осадження Феруму необхідно повторити.

В гарячий фільтрат протягом 20 хв пропускають струмінь сірководню. Поява білої каламуті або навіть білого осаду свідчить про наявність в досліджуваній пробі Цинку. Колбу після пропускання сірководню закривають пробкою, регулярно струшують і через 2 – 3 год утворений осад фільтрують (або центрифугують при швидкості ротора центрифуги 1 тис. об./хв) і промивають 2 – 3 рази 5 см³ дистильованої води, яка насичена сірководнем.

Промитий осад цинку сульфату розчиняють у пробірці з 2 см³ гарячої (60 – 70°C) 10%-вої хлороводневої кислоти. Одну краплю цього розчину поміщують на предметне скельце мікроскопу і виконують на ньому мікрореакцію на наявність Цинку. Для цього нанесену на предметне скельце краплю розчину обережно випарюють на малому полум'ї газового пальника і до утвореного залишку додають 1 краплю 1%-го розчину оцтової кислоти.

Поряд з цією краплею на предметне скельце мікроскопу наносять краплю 20%-го калію меркурій-роданистого і, сполучивши краплини скляною паличкою, неперемішуючи, розглядають утворену суміш. За наявності у досліджуваній пробі Цинку по краях змішаних краплин утворюється білий осад у вигляді розгалуженого «пір'я», що свідчить про наявність Цинку у висхідному зразку.

У цьому випадку продовжують підготовку досліджуваного зразка (*розчину А*, див. вище) до кількісного визначення в ньому Цинку. З цією метою розчин з пробірки (з якої брали 1 краплину для мікрореакції на

виявлення Цинку) переливають у хімічний стакан місткістю 50 см³ і ополіскують пробірку 2 – 3 см³ дистильованої води. Промивний розчин пробірки об'єднують з розчином в хімічному стакані і до об'єданого розчину додають по 1 – 2 краплі 1%-го розчину фенолфталеїну і 10%-го розчину соди (Na₂CO₃) до яскравого рожевого забарвлення. Рідину в хімічному стакані нагрівають до кипіння і кип'ятять 5 – 10 хв, щоб осад Цинку перетворився в кристалічну сполуку цинку карбонат (ZnCO₃).

Через 5 – 10 хв осад цинку карбонат фільтрують, промивають фільтр з осадом 5 – 6 разів гарячою дистильованою водою, підсушують і переносять у зважений порцеляновий тигель (разом з клаптиком фільтру, де знаходиться осад утвореного цинку оксид (ZnO); вагу фільтру вираховують за визначенням ваги точно такого клаптика фільтру. Після цього тигель з ZnO зважують і вираховують вагу самого ZnO, яку при перерахунку на металевий Цинк необхідно помножити на 0,8033.

Прокалений залишок ZnO після охолодження повинен бути білого кольору. Буре забарвлення свідчить про домішки Феруму. В цьому випадку досліджуваний зразок на вміст Цинку необхідно переосадити (див. вище).

Проведення розрахунків:

Концентрацію Цинку в досліджуваному зразку обчислюють за формулою:

$$X_{Zn} = \frac{M \cdot 0,8033 \cdot 1000}{V},$$

де X_{Zn} – концентрація Цинку в досліджуваному зразку, мг/дм³;

M – вага цинк оксиду (ZnO), мг;

V – загальний об'єм взятого для дослідження рідкого зразку (200 см³);

0,8033 – коефіцієнт перерахунку ZnO на металевий Цинк;

1000 – коефіцієнт перерахунку см³ на дм³.

Лабораторна робота 1.16. Кількісне визначення Феруму спектрофотометричним методом з використанням калію роданіду (калію тіоціанату).

Принцип методу. При взаємодії Феруму (Fe^{3+}) з калію роданідом утворюється сполука, яка має червоний колір, інтенсивність забарвлення якої пропорційна концентрації Феруму в досліджуваному зразку.

Матеріали для дослідження: сироватка крові, молоко, сухі тканини рослин чи тварин.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр, терези аналітичні 2-го класу точності, водяна і піщана бані, годинник; 10 н. сульфатна (сірчана) кислота, концентровані хлороводнева (соляна) і нітратна (азотна) кислоти; пергідроль, 20%-й калію роданід (KSCN), 0,04%-й калію перманганат, ізоаміловий спирт, аміак (конц.), подвійної дистиляції вода; пробірки хімічні з тугоплавкого скла; ділильні лійки місткістю 50 см^3 ; піпетки градуйовані місткістю 2 і 5 см^3 ; штатив для пробірок, фільтрувальний папір.

Хід роботи:

Перед проведенням досліджень готують тест-стандартні розчини Феруму для побудови калібрувального графіка і розчин досліджуваного зразка.

1. Приготування основного (матричного) тест-стандартного розчину Феруму: 300 мг залізного дроту або цвяха розчиняють в 3 см^3 двічі перегнаної хлороводневої кислоти з додаванням декількох крапель двічі перегнаної нітратної кислоти. Концентрація Феруму в основному стандартному розчині – 100 мг/см^3 .

2. Приготування серії тест-стандартних градуювальних розчинів Феруму: методом розведення зі основного матричного (стандартного) розчину Феруму в дистильованій воді готують розчини з відповідною

концентрацією Феруму, а саме 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 і 50,0 мкг/см³ Феруму, для яких визначають оптичну густину (екстинцію) при довжині хвилі 490 нм і будують калібрувальний графік : залежність оптичної густини (екстинції) від концентрації Феруму в тест-стандартних розчинах.

3. Приготування досліджуваного зразка: зразок (5 см³ молока, 2 см³ сироватки крові або від 0,1 до 0,2 г сухих тканин рослин чи тварин) попередньо озолують в присутності 10 н. сульфатної кислоти і пергідролію. Для цього зразок у визначеній кількості (див. вище) поміщають в пробірку з тугоплавкого скла і додають в неї 1,5 см³ 10 н. сульфатної кислоти. Нижню частину пробірки, де знаходиться суміш, занурюють у пісок бані та нагрівають до температури 150 – 160°C протягом 30 – 40 хв, поки не випариться волога. Після цього суміш в пробірці охолоджують до кімнатної температури і додають 2 – 3 краплі пергідролію і пробірку трохи нагрівають (до приблизно 30 – 40°C) біля 10 – 15 хв. Якщо суміш залишається кольоровою, то додають по 2 краплі пергідролію і знову пробірку трохи нагрівають. Це повторюють до тих пір, поки суміш в пробірці не стане безбарвною.

В пробірку, де міститься озолений зразок, додають 5 см³ дистильованої води, енергійно перемішують і фільтрують в ділільну лійку. Пробірку і фільтр промивають дистильованою водою 3 рази, доводячи загальний об'єм фільтрату до 20 см³. Додають 1 краплю 0,04%-го розчину калію перманганату, перемішують і, якщо забарвлення зникає, додають ще 1 краплю перманганату. Після цього додають в пробірку 15 см³ ізоамілового спирту і 5 см³ 20%-го розчину калію роданіду. Суміш ретельно струшують, спиртовий шар зливають в кювету спектрофотометра (фотоколориметра) і проводять відрахунок проти чистого ізоамілового спирту при довжині хвилі 490 нм.

Вміст Феруму визначають по калібрувальному графіку, який будують по даним, що отримані при дослідженні тест-стандартних розчинів Феруму.

Обов'язково ставлять так званий «сліпий» дослід на реактиви. Для цього в пробірку вносять 1,5 см³ 10 н. сульфатної кислоти, нагрівають на піщаній бані і додають стільки ж пергідролу, скільки було взято для дослідженої проби. Отриману суміш частково нейтралізують концентрованим аміаком, додаючи його в кількості, яка достатня для нейтралізації половини взятої в дослід сульфатної кислоти. Отриманий розчин обробляють отриманим вище способом.

Проведення розрахунків:

Вміст Феруму (в мг%/г або мг%/см³) в досліджуваному біологічному матеріалі обчислюють за формулою:

$$C = \frac{a \cdot 100}{b},$$

де C – вміст Феруму (в мг%/г або мг%/см³) в досліджуваному зразку;

a – вміст Феруму в досліджуваному розчині, що містить зразок, який знайдений по калібрувальному графіку (в мг);

b – об'єм (см³) або маса (г) біологічного зразка, які взяті для дослідження;

100 – коефіцієнт для перерахунку у відсотки (%).

Лабораторна робота 1.17. Кількісне визначення Купруму спектрофотометричним методом з використанням диетилтіофосфатів.

Принцип методу. Диетилтіофосфати з Купрумом утворюють осад, який розчиняється в органічних реагентах. Розчини купруму диетилтіофосфатів забарвлені в інтенсивний жовто-оранжевий колір. Концентрацію Купруму в досліджуваному зразку визначають по калібрувальному графіку, який будується з використанням тест-стандартних розчинів Купруму.

Матеріали для дослідження: сухі тканини рослин чи тварин.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або колориметр, муфельна піч, терези аналітичні 2-го класу

точності, годинник; купруму сульфат (тричі перекристалізований з води), купрумний купорос (хімічно чистий), вуглець чотирьохлористий (перегнаний), концентровані хлоридна (соляна) і сульфатна (сірчана) кислоти, 0,005 М водний розчин ніколу диетилдитіофосфату ($C_8H_{20}NiO_4P_2S_4$); ділильні лійки на 100 см³, колби мірні на 25 і 1000 см³, пробірки хімічні скляні, піпетки градуйовані на 1, 2 і 10 см³, лійка скляна діаметром 3 – 4 см, порцеляновий тигель високий діаметром 5,5 см, беззольні фільтри.

Хід роботи:

Перед проведенням досліджень готують стандартні розчини Купруму для побудови калібрувального графіка:

1. Приготування основного (матричного) тест-стандартного розчину Купруму: 3,9330 г перекристалізованого купруму купоросу розчиняють в 1 дм³ дистильованої води з додаванням 10 см³ 6 н. розчину сульфатної кислоти. Такий розчин містить 1 мг Купруму в 1 см³ розчину.

2. Приготування серії тест-стандартних градуювальних розчинів Купруму: беруть по 10 см³ основного розчину Купруму з його вмістом 1 мг Купруму в 1 см³, розбавляють дистильованою водою до 1 дм³ і отримують розчин з вмістом Купруму 0,01 мг в 1 см³ розчину. Вже з цього розчину розведенням отримують розчини, які містять 0,5; 1,0; 2,0; 2,5 і 3,0 мкг/см³ Купруму. Визначають оптичну густину (екстинцію) цих тест-стандартних розчинів (при довжині хвилі 465 нм) і будують калібрувальний графік, а саме залежність оптичної густини (екстинції) від концентрації Купруму, який і використовують для визначення концентрації цього металу в досліджуваному зразку.

3. Приготування досліджуваного зразка. Для визначення вмісту Купруму в досліджуваному зразку наважку в 10 – 20 г сухого рослинного або мінералізованого сульфатною кислотою тваринного матеріалу поміщають в тигель і прожарюють в муфельній печі при 550°C до повного озолення. Цей матеріал розчиняють в суміші хлороводневої та сульфатної кислот (3:1),

розбавляють дистильованою водою до об'єму 25 см³ в мірній колбі. Потім 2 см³ цього розчину (досліджувана проба) і 2 см³ дистильованої води (контрольний зразок) поміщають в ділительні лійки на 100 см³, доливають по 10 см³ перегнаного вуглецю чотирихлористого і 2 см³ 0,005 М водного розчину ніколу диетилдитіофосфату, який вводять по краплинах при постійному перемішуванні. Утворений купруму диетилдитіофосфат екстрагують шляхом енергійного струшування ділительних лійок протягом 1 хв. Шар вуглецю чотирихлористого зливають в суху пробірку і фільтрують через беззольний фільтр в кювету спектрофотометра або фотоелектроколориметра. Оптичну густину (екстинцію) забарвленого розчину досліджуваного зразка вимірюють при 465 нм проти контролю за тих же умов, як і тест-стандартів.

Проведення розрахунків:

Отримавши значення оптичної густини (екстинції) досліджуваного зразку, вміст в ньому Купруму визначають по калібрувальному графіку.

Масову частку Купруму (X) в мг/г обчислюють за формулою:

$$X = m_1/m_2,$$

де m_1 – кількість Купруму, яка знайдена за калібрувальним графіком, мг;

m_2 – маса наважки зразка, яка взята для дослідження, г.

Лабораторна робота 1.18. Кількісне визначення Цинку спектрофотометричним методом з використанням дитизону (дифенілтіокарбазону).

Принцип методу. Отриманий в слаболужному чи нейтральному середовищі цинку дитизонат, який розчиняється у вуглеці чотирихлористому або хлороформі, має яскраво-червоний колір. Концентрацію Цинку в

досліджуваному зразку визначають по калібрувальному графіку, який будується з використанням тест-стандартних розчинів Цинку.

Матеріали для дослідження: сухі тканини рослин чи тварин.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр, терези аналітичні 2-го класу точності, водяна і піщана бані, годинник; хімічно чистий металевий цинк, пергідроль, аміак (0,01 н.), 10%-вий калію або натрію цитрат, концентрована і 10 н. сульфатна (сірчана) кислота, 0,02 н. хлороводнева (соляна) кислота, подвійної дистиляції вода, 0,2%-вий натрію диетилдитрикарбамат (свіжоприготовлений), вуглець чотирехлористий (очищений), хлороформ (очищений), 0,12%-вий дитизон (дифенілтіокарбазон), тимолова синь (0,1%-ва в 20%-вому етанолі), 1%-вий фенолфталеїн; ділильні лійки на 50 і 100 см³, пробірки хімічні з тугоплавкого скла і градуйовані місткістю 10 см³ з притертою пробкою, циліндр мірний місткістю 100 см³, піпетки градуйовані на 1 і 5 см³, штатив для пробірок.

Хід роботи:

Перед проведенням досліджень готують стандартні розчини Цинку для побудови калібрувального графіка і розчин досліджуваного зразка:

1. Приготування основного (матричного) тест-стандартного розчину Цинку: 0,2 г хімічно чистого металевого Цинку розчиняють в 50 см³ дистильованої води, яка містить 1 см³ концентрованої сульфатної кислоти, і розчин доводять дистильованою водою до 1 дм³. Такий розчин містить 0,1 г Цинку в 1 см³ розчину.

2. Приготування серії тест-стандартних градуювальних розчинів Цинку: беруть 5 см³ основного розчину Цинку, який містить 0,1 г Цинку в 1 см³ розчину, додають в мірну колбу на 500 см³ і доводять дистильованою водою до мітки; 1 см³ такого розчину містить 1 мкг Цинку.

Для отримання калібрувального графіка в ділильні лійки наливають послідовно 1,0; 2,0; 3,0 і 4,0 см³ основного тест-стандартного розчину, який

містить 1 мкг/см³ Цинку, додають дистильовану воду до 5 см³, а потім ще 5 см³ 10%-вого калію чи натрію цитрату, 1 – 2 краплі 1%-вого розчину фенолфталеїну і ведуть обробку, як досліджуваного зразка (див. нижче). Визначають оптичну густину (екстинцію) стандартних тест-розчинів при довжині хвилі 530 нм і будують калібрувальний графік: залежність оптичної густини (екстинції) від концентрації Цинку, який і використовують для визначення концентрації Цинку в досліджуваній пробі за значенням її оптичної густини (екстинції).

3. Приготування досліджуваного зразка: пробу (1 – 2 г сухих тканин рослин чи тварин) попередньо озолують в присутності 10 н. сульфатної кислоти і пергідролу. Для цього (див. лабораторну роботу 2) досліджуваний зразок поміщають в пробірку з тугоплавкого скла і додають до нього 1,5 см³ 10 н. сульфатної кислоти. Частину пробірки, де знаходиться суміш, занурюють у пісок бані та нагрівають до температури 150 – 160°C протягом 30 – 40 хв, поки не випариться вся волога. В охолоджену до кімнатної температури суміш додають 2 – 3 краплі пергідролу і пробірку трохи нагрівають (до температури 30 – 40°C приблизно 10 – 15 хв). Це повторюється декілька разів до повного знебарвлення суміші, що містить досліджуваний зразок.

Для визначення концентрації Цинку в озоленому рослинному або тваринному матеріалі його поміщають в ділільну лійку з притертою пробкою на 50 чи 100 см³, прибавляють 5 см³ 10%-вого розчину калію чи натрію цитрату (для зв'язування іонів Феруму, Алюмінію та ін.) та 1 – 2 краплі розчину тимолового синього. Потім додають 0,02 н. хлороводневу кислоту до забарвлення розчину у червоний колір і нейтралізують його розбавленим у воді розчином аміаку (1:10) до появи слабого червоного забарвлення, не доводячи його до жовтого кольору.

Для вилучення Цинку додають до проби в ділільній воронці 3 – 5 см³ вуглецю чотирьохлористого і 0,12%-вого розчину дитизону, отриману суміш

ретельно струшують протягом 5 хв. Забарвлений нижній шар розчину зливають і відкидають. У ділильну лійку ще додають 3 – 5 см³ розчину дитизону і після струшування знову відділяють і відкидають нижній шар розчину. Це повторюють до тих пір, поки розчин дитизону не перестане змінювати колір. Після цього до нього додають 5 см³ 10%-вого розчину калію або натрію цитрату, 1 – 2 краплини 1%-вого розчину фенолфталеїну і розчин нейтралізують розбавленим водою аміаком (1:10) до блідорожевого кольору. Потім добавляють 3 – 5 см³ розчину дитизону і струшують 2 хв. Забарвлений шар вуглецю чотирехлористого, який містить цинку дитизонат, переносять в іншу ділильну лійку на 100 см³. До розчину знову додають 3 – 5 см³ розчину дитизону і екстрагують Цинк. Отриманий екстракт об'єднують з іншими, які отримують повторним вилученням Цинку. Цю операцію проводять до тих пір, поки дитизон не перестане міняти колір. До отриманих екстрактів цинку дитизоната додають 50 см³ 0,02 н. розчина хлорводневої кислоти і ділильну лійку струшують 2 – 4 хв. При цьому цинку дитизонат переходить у хлористоокислий водний розчин. До цього розчину додають декілька раз по 0,5 – 1,0 см³ вуглецю чотирехлористого і після струшування кожний раз нижній шар відділяють та відкидають.

В подальшому приступають до останнього вилучення Цинку дитизоном в присутності натрію диетилдитіокарбамата, який зв'язує Кадмій, Плюмбум та інші хімічні елементи в комплекси, що більш стійкі, ніж відповідні комплекси Цинку з дитизоном. До отриманого хлористоокислого розчину додають 5 см³ 10%-вого розчину калію або натрію цитрату, 1 – 2 краплини 1%-вого розчину фенолфталеїну і розчин нейтралізується розбавленим дистильованою водою аміаком (1:10) до отримання блідорожевого кольору. Потім додають 10 см³ 0,2%-вого розчину натрію диетилтіокарбамата, 3 – 5 см³ 0,12%-вого розчину дитизону у вуглецю чотирехлористому і струшують 2 хв. Нижній шар відділяють в ділильну лійку на 50 см³. Вилучення Цинку розчином дитизону повторюють ще 2 – 3 рази. Всі екстракти об'єднують в

ділительну лійку і до них додають 25 см³ 0,01 н. розчину гідроксиду амонію. Після цього нижній шар відділяють в градуйовану пробірку на 10 см³ з притертою пробкою.

До отриманого розчину Цинку додають вуглець чотирьохлористий до мітки на градуйованій пробірці (10 см³) і струшують 2 хв. Через 10 – 15 хв після завершення струшування пробу фотометрують проти очищеного вуглецю чотирьохлористого при 530 нм.

Проведення розрахунків:

Вміст Цинку (в мг%/г) в досліджуваному біологічному матеріалі (тканини рослин або тварин) обчислюють за формулою:

$$C = \frac{a \cdot 100}{b},$$

де C – вміст Цинку (в мг%/г) в досліджуваному зразку;

a – вміст Цинку в досліджуваному розчині, що знайдений по калібрувальному графіку (в мг);

b – маса біологічного об'єкту (в г) яка взята для досліджень;

100 – коефіцієнт для перерахунку у відсотки (%).

Лабораторна робота 1.19. Кількісне визначення Мангану спектрофотометричним методом з використанням амонію персульфату.

Принцип методу. В кислому середовищі амонію персульфат в присутності іонів Аргентума окиснює Mn^{2+} до MnO_4 , який має пурпурове забарвлення. Концентрацію Мангану в досліджуваному зразку визначають по калібрувальному графіку з використанням тест-стандартних розчинів Мангану.

Матеріали для дослідження: сухі тканини рослин чи тварин.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр, терези аналітичні 2-го класу точності,

водяна і піщана бані, годинник; концентровані сульфатна (сірчана), нітратна (азотна), фосфорна і щавлева кислоти, 2%-вий аргентуму нітрат (зберігати в темноті), 10%-вий амонію персульфат (свіжеприготовлений), 10%-вий натрію сульфат, подвійної дистиляції вода, калію перманганат (1 н.), пергідроль; колби мірні на 50 і 100 см³, хімічні скляні стакани місткістю 100 см³, піпетки градуйовані на 1, 5 і 10 см³, хімічні пробірки з тугоплавкого скла, штатив для пробірок.

Хід роботи:

Готують тест-стандартні розчини Мангану для побудови калібрувального графіка і розчин досліджуваного зразка.

1. Приготування основного (матричного) тест-стандартного розчину Мангану: до 91 см³ 1 н. розчину калію перманганату (титр калію перманганату встановлюється по щавлевій кислоті) додають 100 см³ дистильованої води, 1 см³ концентрованої сульфатної кислоти і краплинами 6 см³ 10%-вого розчину натрію сульфату. Розчин кип'ятять до зникнення запаху сульфїду оксиду, охолоджують, переносять в мірну колбу на 1 дм³ і доводять дистильованою водою до мітки. Такий розчин містить 100 мкг/см³ Мангану.

2. Приготування серії тест-стандартних градуювальних розчинів Мангану: в 5 хімічних стаканів об'ємом 100 см³ вносять 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 і 5,0 см³ основного стандартного розчину Мангану, який містить 100 мкг/см³ Мангану в 1 см³, по 20 см³ дистильованої води та реактиви для визначення Мангану (див. нижче), а саме по 1 см³ 2%-вого розчину аргентуму нітрату і 5 см³ 10%-вого розчину амонію персульфату. Розчин кип'ятять 3 – 4 хв, охолоджують і переносять у мірну колбу на 50 см³, куди додають дистильовану воду до мітки, яка містить окиснювач (до 100 см³ дистильованої води додають 3 см³ концентрованої сульфатної кислоти, 1 см³ 2%-вого розчину аргентуму нітрату і 5 см³ 10%-вого амонію персульфату; отриманий розчин кип'ятять до тих пір, поки не припиниться виділення

бульбашок газу). Розчини містять Манган в концентрації 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 і 10,0 мкг/см³.

Отримані охолоджені розчини фотометрують при 530 нм проти «сліпої» проби, що містить всі реактиви, як і досліджуваний зразок, але без Мангана, тобто визначають їх оптичну густину (екстинцію) і за отриманими результатами будують калібрувальний графік: залежність оптичної густини (екстинції) від концентрації Мангану.

3. Приготування досліджуваного зразка: 5 – 10 г сухих рослинних або тваринних тканин попередньо озолують (в присутності 10 н. сульфатної кислоти і пергідролі; див. лабораторну роботу 2). Для цього досліджуваний зразок поміщають в пробірку з тугоплавкого скла і додають до нього 1,5 см³ 10 н. сульфатної кислоти. Нижню частину пробірки, де знаходиться суміш, занурюють у пісок бані і нагрівають до температури 150 – 160°C протягом 30 – 40 хв, поки не випариться вся волога. В охолоджену до кімнатної температури суміш додають 2 краплини пергідролі і пробірку трохи нагрівають (до температури 30 – 40°C) приблизно 10 – 15 хв. Це повторюється до повного знебарвлення суміші, яка містить досліджуваний зразок.

Отриманий озоліат переносять в мірну колбу на 100 см³ і доводять дистильованою водою до мітки. До 10 см³ цього розчину в хімічному стакані додають по 2 см³ концентрованих сульфатної і фосфорної кислот. Розчин доводять до 20 см³ дистильованою водою, а потім до нього додають 1 см³ 2%-вого розчину аргентуму нітрату і 5 см³ 10%-вого розчину амонію персульфату. Після цього для окиснення Мангану і розкладання надлишку амонію персульфату розчин кип'ятять 3 – 4 хв. Після охолодження до кімнатної температури розчин переносять в мірну колбу на 50 см³ і доводять до мітки дистильованою водою, яка містить окиснювач (див. вище, до 100 см³ дистильованої води додають 3 см³ концентрованої сульфатної кислоти, 1 см³ 2%-вого розчину аргентуму нітрату і 5 см³ 10%-вого амонію

персульфату; отриманий розчин кип'ятять до припинення виділення бульбашок газу).

Після окиснення отриманий охолоджений до кімнатної температури розчин фотометрують при 530 нм (в тих же умовах, як і тест-стандартні розчини Мангану для побудови калібрувального графіка, див. вище).

Проведення розрахунків:

Вміст Мангану (в мг%/г) в досліджуваному біологічному матеріалі (тканини рослин або тварин) обчислюють за формулою:

$$C = \frac{a \cdot 1000}{b},$$

де C – вміст Мангану (в мг%/г) в досліджуваному зразку;

a – вміст Мангану в досліджуваному розчині, що містить зразок, який знайдений по калібрувальному графіку (в мг);

b – маса тканини (в г), яка взята для дослідження;

1000 – коефіцієнт для перерахунку (в мг%/г) з урахуванням розведення.

Лабораторна робота 1.20. Визначення вмісту важких металів (Кадмію, Купруму, Плюмбуму, Феруму та Цинку) в харчових продуктах методом атомно-абсорбційної спектрометрії.

Принцип методу. Метод атомно-абсорбційного аналізу речовин базується на принципах атомної спектрометрії.

Нітратнокислі мінералізати досліджуваного зразка і тест-стандартів, які отримують сухим озоленням або кислотною екстракцією з озоленням, розпиляють в ацитиленово-повітряному полум'ї. Молекули, які містять метали і потрапили в полум'я, дисоціюють на атоми, що поглинають світло від додаткового джерела (випромінювача) при довжині хвилі їх резонансних ліній спектру. Ступінь поглинання світла атомами пропорційна їх концентрації в досліджуваних пробах.

Матеріали для дослідження: харчові продукти, зокрема, овочі, плодово-овочеві соки тощо.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: атомно-абсорбційний спектрометр, іономір, терези аналітичні 2-го класу точності, порцеляновий тигель об'ємом 50 см³, сушильна шафа, електронагрівач (до температури 150 °С), муфельна піч (до температури 450 °С), штативи для пробірок; нітратна (азотна) кислота (10- і 30 %-ва), хлороводнева (соляна) кислота (3,7- і 0,37%-ва), натрію гідроксид (4%-вий), амонію гідроксид (концентрований і 4%-вий), магнію нітрат (50%-вий), свіжоприготовлений амонію піролідіндитіокарбонат (C₆H₁₂S₂N₂, АПДК), який готують наступним чином: 2,0 г амонію піролідіндитіокарбонату розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі місткістю 100 см³ і доводять об'єм до мітки; альтернативним до АПДК є 2,5%-вий розчин диетилдитіокарбамату натрію (ДДТК-Na), кислота цитринова (лимонна) для приготування буферного розчину з рН 3, який готують наступним чином: 2,101 г цитринової кислоти (C₆H₈O₇·H₂O) розчиняють в 20 см³ розчину натрію гідроксиду (4%-вому) в мірній колбі місткістю 100 см³ і дистильованою водою доводять об'єм до мітки, потім 40,3 см³ отриманого розчину переносять в мірну колбу місткістю 100 см³ і доводять об'єм до мітки розчином хлороводневої кислоти (0,37%-вої), метиловий оранжевий (25%-вий спиртовий розчин) або бромкрезоловий зелений (0,1%-вий спиртовий розчин), метилізобутилкетон безводний або бутилацетат, бромтимоловий синій (0,1%-вий), тест-стандартні розчини Плюмбуму, Кадмію, Купруму, Цинку, Феруму, згідно відповідного ДСТУ, дистильована вода, ацетиленово-повітряна суміш регульованого співвідношення; мірні колби об'ємом 50 і 100 см³, пробірки об'ємом 5 і 10 см³, градуйовані піпетки об'ємом 1–5 см³, хімічні скляні стакани об'ємом 25 см³, штатив для пробірок, фільтрувальний папір.

Хід роботи:

Підготовка проб, які аналізуються, включає процес мінералізації. Тверді проби (0,5–1 г) обвуглюють у порцеляновому тиглі до припинення виділення диму при температурі близько 150°C на електронагрівальному приладі, а рідкі (25 см³ розчину, який містить 0,5–1 г речовини) попередньо випаровують нагріванням до сухого залишку у сушильній шафі, а потім проводять обвуглення.

Після закінчення обвуглення до тигля зі залишком проби додають по краплям 30%-вий розчин нітратної кислоти (5–10 капель, а потім при необхідності ще декілька) і продовжують мінералізацію на електронагрівачі до повного випалення проби.

Потім пробу поміщають у муфельну піч з температурою 200–250°C, поступово на 50°C кожні 30 хв підвищують температуру до 450°C. Мінералізацію при цій температурі продовжують до отримання сірої золи (проводять озолення). Час озолення складає 10–15 год.

Тигель зі золою виймають з муфельної печі і охолоджують до кімнатної температури.

При застосуванні способу сухого озолення (див. нижче) або кислотної екстракції з озоленням у тиглі розчиняють золу при нагріванні у 30%-вій нітратній кислоті (1:1) за об'ємом із розрахунку 1–5 см³ кислоти на наважку в залежності від зольності проби. Отриманий розчин випаровують, а осад розчиняють у 15–20 см³ хлороводневої кислоти (як правило 3,7%-вій), переносять у мірну колбу об'ємом 25 см³ і доводять до позначки тією ж кислотою.

Тест-стандарти (Плюмбуму, Кадмію, Феруму, Купруму, Цинку) готують згідно існуючих правил за відповідними ДСТУ. При сухому озоленні у мірні колби об'ємом 100 см³ додають по 2,0 см³ 50%-вого розчину магнію нітрату і такий же об'єм робочого розчину металу, щоби концентрація цього металу забезпечувала лінійні межі градуйованого графіка (для Плюмбуму 0,1–2,0 мг/см³; Кадмію 0,02–1,0 мг/см³; Купруму 0,05–5 мг/см³; Цинку і Феруму 0,1–

10,0 мг/см³). Потім доводять вміст колби до мітки 10%-вим розчином нітратної кислоти.

Контрольний («нульовий») градуйований розчин містить розчини магнію нітрату і нітратної кислоти, його готують таким же чином, як проби, що досліджуються та проби-стандарти, але додають тільки реактиви, без додавання металів (замість їх розчину додається відповідний об'єм дистильованої води).

У разі використання попередньої екстракції до градуйованих розчинів додають по 3 краплини 2%-го розчину метилового оранжевого (при використанні АПДК), або 0,1%-го розчину бромкрезолового зеленого (при використанні ДДТК-Na).

Для побудови калібрувальних графіків допускається використання готових стандартних розчинів металів на основі нітратної або хлороводневої кислот з масовою часткою не менше 1% (як правило, 10 і 3,7%-вий розчини, відповідно). Таким же чином готують і контрольні («нульові») стандартні проби.

Готують, як правило, тест-стандарти металів, що досліджуються, в об'ємі 5 см³ послідовним розбавленням основних (найбільш концентрованих) розчинів контрольним («нульовим») розчином. Тест-стандарти за концентрацією досліджуваного металу повинні бути в лінійних межах калібрувального графіка, в які потрапляє досліджувана проба.

Градувальний графік будують наступним чином: по вісі абсцис відкладають концентрацію металу в тест-стандартах (мг/кг або мг/дм³), а по вісі ординат – відповідні їм значення екстинції (оптичної густини).

У випадку коли концентрація металу в пробі, що досліджується, вище верхньої межі діапазону робочої концентрації, то проводиться розбавлення досліджуваної проби контрольним розчином («нульовим»). Коефіцієнт розбавлення (K_p) повинний бути таким, щоб концентрація металу у

розведеному розчині знаходилася приблизно в середині робочого діапазону. Він обчислюється за формулою (при $K_p > 1$):

$$K_p = V_2 / V_1,$$

де V_1 і V_2 – об'єми (см³) проби, взятої для розведення, та вже розведеного розчину, відповідно.

При екстракційному концентруванні у хімічні стакани об'ємом 25 см³ поміщають досліджуваний розчин в залежності від необхідного ступеня концентрації об'ємом 5–10 см³, а також такий же об'єм контрольного розчину, та доводять об'єм до 20 см³. Крім того, в такі ж стакани поміщають по 20 см³ калібрувальних розчинів.

Коефіцієнт концентрування (K_k) обчислюються за формулою:

$$K_k = V_2 / V_1,$$

де V_1 і V_2 – об'єми (см³) проби, взятої для концентрування, та з концентрованого розчину, відповідно.

Для кількісного визначення досліджуваних металів методом градуювального графіка приготувані тест-стандарты вводять в атомно-абсорбційний спектрометр після побудови калібрувального графіка. Всі виміри проводять згідно «Інструкції по експлуатації» конкретного атомно-абсорбційного спектрометра.

Спочатку проводять виміри з контрольним («нульовим») стандартом, потім з тест-стандартами і будують калібрувальний графік, а вже наостанок – з пробами, що досліджуються.

Виміри кожної проби проводять не менше 3-х разів і вираховують середнє арифметичне значення.

Для вимірювання вмісту металів використовують найбільш чутливі лінії спектру поглинання металів. Так, наприклад, для Плюмбуму 288,3 або 217 нм в залежності від технічних характеристик спектрометра, для Кадмію – 288,8

нм, для Купруму – 324,8 нм, для Цинку – 213,9 нм, для Феруму – 248,3 нм. Вибір резонансних ліній спектрів поглинання обирають за максимальним відношенням сигнал/шум при мінімальному дрейфі нульової лінії і максимальній стабільній чутливості. Точне співвідношення потоків ацетилен/повітря і висоту пальника встановлюють за такими ж критеріям, як при розпиленні в полум'ї будь-якого градуйованого розчину в робочому діапазоні концентрацій металів, що досліджуються.

Проведення розрахунків:

Концентрацію металу в пробі, що досліджується обчислюють за формулою:

$$C = \frac{C_r \cdot V \cdot 1000}{m},$$

де C – концентрація металу в пробі, яка аналізується, мг/г (або мг/см³);

C_r – концентрація металу в пробі, що аналізується, яка знайдена за калібрувальним графіком, мг/г (або мг/см³);

V – об'єм мінералізату, см³;

m – маса наважки речовини, що досліджується, г (або її об'єм, взятий для мінералізації, см³);

1000 – коефіцієнт перерахунку концентрації металу з мг/г (або мг/см³) в мг/кг (або мг/дм³).

Сучасні атомно–абсорбційні спектрометри мають комп'ютерні системи розрахунку концентрації металів, що досліджуються, з використанням рекомендованих комп'ютерних програм.

Лабораторна робота 1.21. Визначення вмісту Арсену в харчових продуктах методом атомно-абсорбційної спектрометрії.

Принцип методу. Метод базується на здатності хімічних елементів (зокрема, Арсена) досліджуваного зразка переходити в атомарний стан при атомізації з поглинанням світла атомами характеристичних (резонансних)

для атомів ліній спектра від додаткового джерела. Ступінь поглинання світла, яка визначається оптичною густиною, пропорційна концентрації атомів досліджуваної речовини (Арсену).

Розрахунок концентрації Арсену в досліджуваному зразку проводять з використанням калібрувального графіка, який побудований за використання тест-стандартних розчинів Арсену.

Матеріали для дослідження: харчові продукти, зокрема, м'ясні, молочні, рибні та хлібобулочні, овочі, фрукти і продукти їх переробки, алкогольні та безалкогольні напої, плодово-овочеві соки, мінеральна вода.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: атомно-абсорбційний спектрометр, терези аналітичні 2-го класу точності, муфельна піч, плитка електрична, водяна баня, водоструйний насос; стандартний розчин солі Арсену з вмістом цього хімічного елемента $0,1 \text{ мг/см}^3$ згідно ДСТУ, концентровані та $0,05 \text{ н.}$ нітратна (азотна) та хлороводнева (соляна) кислоти, а також розведена дистильованою водою (1:1) нітратна кислота, концентрована і розведена дистильованою водою (1:9) сульфатна (сірчана) кислота, перикис гідрогену (водню), окис і ніtratoкислий манган (10%-ві розчини в дистильованій воді), дистильована вода; колби мірні місткістю 25, 50, 100 і 1000 см^3 , колби К'єндаля місткістю 500 см^3 , колби плоскодонні місткістю 100 см^3 , воронка для фільтрування, порцелянові тігли чи чашки, скляні кульки для забезпечення рівномірного кипіння розчинів, пробірки хімічні скляні, піпетки градуйовані з об'ємом дозування $1 - 10 \text{ см}^3$, дозатор з об'ємом дозування 20 мм^3 , штатив для пробірок, беззольні фільтри.

Хід роботи:

Перед початком досліджень готують тест-стандартні розчини Арсену для побудови калібрувального графіка і розчин досліджуваних зразків.

1. Приготування основного (матричного) тест-стандартного розчину Арсена: в мірну колбу місткістю 100 см^3 вносять $2,0 \text{ см}^3$ $0,1 \text{ мг/см}^3$ тест-стандартного розчину Арсену і доводять до позначки (100 см^3)

дистильованою водою, ретельно перемішують. Такий розчин містить 2 мкг/см³ Арсену.

2. Приготування серії тест-стандартних градувальних розчинів Арсену: в мірні колби місткістю 100 см³ вносять послідовно 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 і 15,0 см³ основного (матричного) розчину Арсену з концентрацією 2,0 мкг/см³ і доводять до позначки (100 см³) та ретельно перемішують. Отримують тест-стандартні розчини Арсену містять цей хімічний елемент, відповідно, в концентрації 0,02; 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,2 і 0,3 мг/см³.

3. Приготування 0,15%-вого розчину ортофосфорної кислоти. Відбирають 1,5 см³ концентрованої ортофосфорної кислоти в мірну колбу місткістю 1000 см³ та обережно доводять дистильованою водою до позначки (1000 см³), ретельно перемішують.

4. Приготування досліджуваних зразків: харчові продукти, які містять вуглекислий газ, дегазуються 2 – 3 хв. за допомогою водоструйного насосу.

В тигель або чашку вносять наважку досліджуваного продукту. Мінімальна маса (об'єм) наважки вказана в Таблиці 1.1.

Таблиця 1.1 – Мінімальна наважка (в грамах або об'ємах зразка в кубічних сантиметрах) при дослідженні харчових продуктів на вміст Арсену.

Найменування харчових продуктів	Наважка (г або см ³)
М'ясні продукти, консерви	10
Молоко і молочні продукти	15
Риба і рибні продукти	10
Хлібобулочні, мукольні та круп'яні вироби	15
Цукор та кондитерські вироби	15
Жирові вироби	15
Фрукти, овочі та продукти їх переробки	5
Пиво, вино, кон'як та інші алкогольні напої	15
Безалкогольні напої, соки	15
Мінеральна вода	25

Спосіб сухої мінералізації зразків: харчові продукти з високим вмістом цукру (джеми, компоти, лікери тощо) обробляють сульфатною кислотою, яка розбавлена дистильованою водою (1:9) із розрахунку 5 см³ розбавленої кислоти на 1г сухої речовини і витримують протягом 2-х діб.

У випадку, коли вміст вологи в харчовому продукті вище 80%, до наважки такого продукту вносять рівну кількість 10%-го окису і нітратокислого мангану із розрахунку 2 – 5% від маси (об'єму) наважки, суміш ретельно перемішують.

У дослідженнях, коли вміст вологи в харчовому продукті нижче 80% , до такої наважки вносять рівну кількість 10%-го окису і нітратокислого мангану із розрахунку 10 – 15 % від маси (об'єму) наважки, невелику (1 – 2 см³) кількість дистильованої води, суміш ретельно перемішують.

Отримані таким способом проби сушать на електроплитці зі слабким нагрівом (30 – 40°C), поступово піднімаючи температуру до припинення виділення диму.

Тігли або чашки із висушеними зразками поміщають у муфельну піч і поступово (зі ступенями по 100°C за годину) підвищують температуру в цій печі до 450°C. При цій температурі витримують зразки в тиглях (чашках) до утворення сірої золи.

Тигель (чашку) з охолодженою золою змочують декількома краплями дистильованої води та концентрованої нітратної кислоти, упарюють в муфельній печі при температурі 250°C, доводять температуру до 450°C і витримують 1 год. Мінералізацію вважають закінченою, коли зола набуває білого кольору (або тільки трохи забарвлена). Якщо в тиглі (чашці) після цього залишаються обвуглені частки, то цю процедуру повторюють.

Спосіб вологої мінералізації: наважку твердих та пореподібних харчових продуктів на обеззоленому фільтрі поміщають в колбу К'єндаля місткістю 500 см³ (або в плоскодонну колбу місткістю 100 см³), і проводять всі операції як з рідким зразком.

Наважку рідких зразків вносять в плоскодонну колбу місткістю 100 см³ та упарюють на електроплитці до об'єму 5 см³.

В подальшому в колбу зі зразком вносять концентровану нітратну кислоту із розрахунку 10 см³ на кожні 5г (5 см³) харчового продукту і витримують після збовтування 15 хв. Після цього в колбу вносять 3 – 5 скляних кульок для поліпшення кипіння отриманої суміші, нагрівають на електроплитці та упарюють об'єм зразка до 5 см³.

Колбу зі зразком охолоджують, додають 10 см³ концентрованої нітратної кислоти і знову упарюють до об'єма 5 см³. Цю процедуру повторюють 2 – 4 рази до припинення виділення бурого диму.

По завершенню цього процесу в колбу вносять 10 см³ концентрованої нітратної кислоти, 2 см³ концентрованої сульфатної кислоти та 2 см³ перекису гідрогену (вноситься останнім) на кожні 5 г (5 см³) харчового продукту. Вміст колби упарюють до об'єма 5 см³. При утворенні рідини коричневого кольору колбу охолоджують і до неї додають 5 см³ концентрованої нітратної кислоти, 2 см³ перекису гідрогену та продовжують нагрівати до появи білого диму. Якщо розчин при цьому не став прозорим, то процедуру повторюють. Мінералізацію вважають закінченою, якщо розчин після охолодження стає прозорим.

Для вилучення залишків кислот в охолоджену колбу додають 10 см³ дистильованої води і нагрівають до появи білого диму, після цього кип'ятять 10 хв та охолоджують. Процедуру повторюють двічі. Якщо після цього утворюється осад, то в колбу вносять 20 см³ дистильованої води, 2 см³ концентрованої сульфатної кислоти, 5 см³ концентрованої хлороводневої кислоти і кип'ятять до розчинення осаду, додаючи дистильовану воду, що випаровується. Після розчинення осаду розчин упарюють на водяній бані.

В тигель або чашку з пробою, що озолена в будь-який спосіб, додають 5 см³ розбавленої дистильованою водою нітратної кислоти (1:1) та нагрівають на водяній бані до розчинення золи. Розчин упарюють до

залишку, який розчиняють в 20 см³ 0,05 н. нітратної кислоти, переносять в мірну колбу місткістю 25 см³ та доводять до позначки (25 см³).

Якщо зола в цьому випадку не розчиняється повністю, то розчин з осадом доводять до об'єму 40 см³ 0,05 н. хлороводневою кислотою і підігрівають на водяній бані при слабкому нагріві (30 – 40°C) протягом 30хв. При знову нерозчинному осаді розчин фільтрують через промитий розчинником (0,05 н. хлороводневою кислотою) фільтр, осад промивають і відкидають, а фільтрат переносять у мірну колбу місткістю 50 см³ та доводять до позначки (50 см³) тією ж кислотою.

Отримані таким чином розчини зразків досліджуваних харчових продуктів використовують для визначення в них вмісту Арсену. У випадку, коли концентрація Арсену в пробі, що досліджується, вище верхньої межі діапазону тест-стандартних розчинів цього хімічного елемента, то проводять розбавлення цієї проби 0,05 н. розчином хлороводневої кислоти. Коефіцієнт розбавлення (K_p) повинен бути таким, щоби концентрація Арсену у розведеній пробі знаходилася приблизно в середині робочого діапазону тест-стандартів. При $K_p > 1$ цей коефіцієнт обчислюється по формулі:

$$K_p = V_2 / V_1,$$

де V_1 і V_2 – об'єми (см³) взятої для розведення проби та розведеного розчину, відповідно.

Виконання вимірювання: підготовка атомно-абсорбційного спектрометра (вмикання та вивід на робочий режим) проводиться згідно «інструкції по експлуатації» конкретного спектрометра.

Вимірювання концентрації Арсену проводять при довжині хвилі 193,7 нм. Спочатку виконують попереднє контрольне вимірювання для з'ясування концентрації Арсену в досліджуваній пробі. Проводять вимірювання для 20 см³ дистильованої води («холостий» розчин),

досліджуваного зразка та тест-стандарту з максимальною концентрацією Арсену, що відповідає верхній межі робочого діапазону тест-стандартів.

Проведення розрахунків:

Результати попередніх вимірювань обчислюють по формулі:

$$C_x = \frac{C_o(D_{x^c} - D_{хол.})}{D_o - D_{хол.}},$$

де C_x – концентрація Арсену в досліджуваній пробі, мг/дм³;

C_o – концентрація Арсену в тест-стандарті, яка наближена до такої в досліджуваній пробі, мг/дм³;

D_x , D_o і $D_{хол.}$ – оптична густина досліджуваної проби, тест-стандарту та «холостої» проби, відповідно.

Якщо попереднє вимірювання знаходиться в робочому діапазоні тест-стандартів, то його вважають таким, що воно придатне для визначення концентрації Арсену в досліджуваній пробі. Тоді по черзі фотометрують «холостий» розчин, пробу і один (найближчий за значенням оптичної густини до проби) тест-стандарт в необхідній кількості раз (не менше трьох) для отримання статистично вірогідних даних. Результати вимірювань обраховують по вищенаведеній формулі.

У випадку, коли попереднє вимірювання концентрації Арсену в пробі перевищує значення верхньої межі робочого діапазону тест-стандартів, пробу необхідно розбавити так, щоби концентрація досліджуваного хімічного елемента знаходилась в робочому діапазоні тест-стандартів.

Результати обчислюють по формулі:

$$C_x = \frac{K_p C_o (D_x - D_{хол.})}{(D_o - D_x)}$$

де C_x , C_o , D_x , D_o і $D_{хол.}$ – див. позначення вищенаведеної формули;

K_p – коефіцієнт розведення.

Лабораторна робота 1.22. Визначення вмісту розчинених у воді хімічних елементів методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно-зв'язаною плазмою.

Принцип методу. Основа методу – отримання і аналіз емісійних спектрів. Пробу розпилюють, утворений аерозоль вводять у плазмовий пальник, де відбувається атомізація зразка і збудження утворених атомів. Це генерує радіочастотна індуктивно-зв'язана плазма. Збуджені атоми при поверненні в основний енергетичний стан випромінюють характерні для кожного хімічного елемента емісійні лінії. Спектр цього випромінювання розкладається на дифракційній ґратці атомно-емісійного спектрометра, а інтенсивність ліній реєструє його детектор. Сигнали від детектора контролюють та обробляють за допомогою комп'ютерної системи.

За використання цього методу можна визначити, зокрема, вміст у природних, стічних та питних водах наступних важких металів: Ag, Al, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, V, W, Zn, Zr, а також ще ряд хімічних елементів – B, Ca, K, Li, Mg, Mo, Na, P, S, Si, Sn, Ti (Таблиця 1.2).

Таблиця 1.2 – Рекомендовані довжини хвиль вимірювання емісії збуджених атомів хімічних елементів і межі виявлення цих елементів у воді.

Хімічний елемент	Довжина хвилі, нм	Межа виявлення, мг/дм ³	Хімічний елемент	Довжина хвилі, нм	Межа виявлення, мг/дм ³
Ag	328,068	0,02	Mo	202,030	0,03
	338,289	0,02		204,589	0,05
Al	308,250	0,1	Na	589,592	0,1
	396,152	0,1		588,995	0,02
	167,080	0,04		330,237	0,02
As	193,696	0,1	Ni	231,64	0,1
	197,197	0,1			
	189,042	0,08			
B	208,959	0,005	P	178,287	0,5
	249,678	0,006		213,618	0,1

	247,773	0,01		214,914 177,428	0,1 0,5
Ba	233,527 455,403 493,409	0,004 0,002 0,003	Pb	220,353 383,306	0,2 0,07
	313,042 234,861	0,002 0,005	S	182,036 180,669	0,5 0,5
Bi	232,061 306,772	0,04 0,08	Sb	206,833 217,581	0,1 0,1
Ca	315,887 317,933 393,366	0,1 0,01 0,002	Se	196,026 203,985	0,1 0,1
Cd	214,438	0,01	Si	251,611	0,02
	226,502	0,01		212,412	0,02
	228,802	0,01		288,158	0,03
Co	228.616	0,01	Sn	235,848 189,980	0,1 0,1
Cr	205,552	0,01	Sr	407,771	0,005
	267,716	0,01		421,552	0,01
	283,563	0,01		460,733	0,1
	284,325	0,01			
Cu	324,754	0,01	Ti	334,941	0,005
	327.396	0,01		336,121	0,01
				337,280	0,01
				368,520	0,01
K	769,90	2	V	290,882	0,01
Mg	279,079	0,03		292,402	0,01
	279,553	0,0005		310,230	0,01
				311,071	0,01
Mn	257,610	0,002	W	207,911	0,03
	293,308	0,02		209.860	0,06
Zn	206,191	0,01		239,709	0,06
	213,856	0,005		222,589	0,06
				202,998	0,06
Zr	343,823	0,01			
	354,262	0,05			

Матеріали для дослідження: природна або питна вода.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: атомно-емісійний спектрометр з індуктивно-зв'язаною плазмою (ICP-AES), керований комп'ютером з корекцією фону, з радіочастотним генератором і системою подачі газу аргону, в якому створюється плазма, з пневматичним розпиленням проби, терези аналітичні 2-го класу точності, рН-метр (іономір), електроплитка, пристрій для фільтрування; вода деіонізована, газ аргон з об'ємною часткою Аргону не менше 99,999%, кислота нітратна (азотна, $\rho=1,40$ г/см³), кислота хлороводнева (соляна, 0,2 моль/дм³), кислота сульфатна (сірчана, $\rho=1,84$ г/см³), стандартні розчини хімічних елементів (одно- або багатоелементні – 1 мг/см³); пробірки місткістю 10 см³ і штатив для них, колби мірні місткістю 100 і 1000 см³, хімічні скляні стакани місткістю 50 см³, флакони поліетиленові або політетрафторетиленові (ПТФЕ) місткістю 250 см³ або 500 см³, градуйовані піпетки місткістю 1–10 см³, мікрошприци або дозатори автоматичні з регульованим об'ємом до 1,0 см³; до 5,0 см³ та до 10,0 см³; мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм.

Хід роботи:

Перед початком роботи готують ряд робочих розчинів хімічних елементів і змішаних багатоелементних розчинів з розчину стандартних зразків 1 мг/см³ з урахуванням можливих спектральних завад, які обумовлені перекриванням спектральних ліній хімічних елементів, а також беруть до уваги хімічну сумісність, можливий гідроліз вихідних сполук. Щоб запобігти таким завадам, до стандартних розчинів зазвичай додають 0,5 – 1,0 см³ певних реактивів – нітратну, сульфатну або хлороводневу кислоти, «царську горілку» – 5%-ві розчини і це враховують при визначенні об'ємів тест-стандартів та зразка.

Робочі стандартні розчини хімічних елементів готують і зберігають в поліетиленових або політетрафторетиленових флаконах при температурі 4 – 8°C до 2-х місяців.

1. Робочий елементний стандартний розчин Бору (10 мкг/дм³). В мірну колбу об'ємом 1 дм³ додають 10 см³ стандартного розчину Бору (В) 1 мг/см³, 50 см³ нітратної кислоти ($\rho=1,40$ г/см³) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

2. Елементний стандартний розчин Барію (10 мкг/дм³). У мірну колбу об'ємом 1 дм³ додають 10 см³ стандартного розчину Барію (Ва) 1 мг/см³, 50 см³ нітратної кислоти ($\rho=1,40$ г/см³) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

3. Елементний стандартний розчин Аргентуму (10 мкг/дм³). У мірну колбу об'ємом 1 дм³ додають 10 см³ стандартного розчину Аргентуму (Аг) 1 мг/см³, 50 см³ нітратної кислоти ($\rho=1,40$ г/см³) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

Примітка: робочі стандартні розчини 1–3, тобто розчини В, Ва і Аг, за зазначених умов можуть спричинювати утворення осаду, тому їх готувати потрібно в окремих флаконах.

4. Багатоелементний розчин Са, Mg, К, Na, S і Р (10 мкг/дм³). У мірну колбу об'ємом 1 дм³ додають по 10 см³ кожного 1 мг/см³ стандартного розчину із вказаних хімічних елементів, 50 см³ нітратної кислоти ($\rho=1,40$ г/см³) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

5. Багатоелементний розчин Sn, Ti, As, Se, Sb (10 мкг/дм³). У мірну колбу місткістю 1 дм³ додають по 10 см³ кожного 1 мг/см³ стандартного розчину із вказаних хімічних елементів, 50 см³ нітратної кислоти ($\rho=1,40$ г/см³) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

6. Багатоелементний розчин Al, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mn, Mo, Ni, Zn, V, Bi, Sr, Zr W, (10 мкг/дм³). У мірну колбу місткістю 1 дм³ додають по 10 см³ кожного 1 мг/см³ стандартного розчину із вказаних хімічних елементів, 50 см³ нітратної кислоти ($\rho=1,40$ г/см³) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

7. Неробочий розчин з реактивом (нітратною кислотою). В поліетиленовий або політетрафторетиленовий флакон вносять 1 см^3 нітратної кислоти з $\rho=1,40 \text{ г/см}^3$ і 100 см^3 деіонізованої води.

Перед визначення хімічних елементів пробу води фільтрують крізь мембранний фітром з діаметром пор $0,45 \text{ мкм}$ відразу після її відбору. Перші від 50 см^3 до 100 см^3 проби використовують для промивання фільтрувального пристрою.

У подальшому проби води підкислюють $0,5 \text{ см}^3$ нітратної кислоти ($\rho=1,40 \text{ г/см}^3$) на кожні 100 см^3 (до рН менше 2) під час відбирання проби.

Якщо в процесі підкислення (при додаванні кислоти, зокрема нітратної), транспортування або зберігання проб, які аналізуються, утворилися осади, то перед аналізуванням їх розчиняють, додаючи додатково нітратну кислоту та (або) нагріваючи проби на електроплитці.

Початок аналізу приготовленої проби води починають з підключенням атомно-емісійного спектрометра до електромережі, його прогрівання 30 хв , встановлюють робочі параметри і продувають газом Аргоном $30\text{--}60 \text{ хв}$. Задають відповідну робочу конфігурацію комп'ютера (програму TIVA), налаштовують та проводять калібрування спектрометра згідно «Інструкції по експлуатації» з використанням елементних і багатоелементних робочих стандартних розчинів.

Систему спектрометра перед початком роботи і після кожного контрольного зразка промивають неробочим розчином з реактивом (див. вище). Цим же розчином промивають систему приладу до і після кожної проби, яка аналізується.

Через кожні 10 проб аналізують «контрольну» пробу, яка містить розчиненні контрольні (стандартні) хімічні елементи. Якщо отримані значення вмісту хімічних елементів не перебувають в межах $\pm 5\%$ від очікуваних значень або нижче встановлених меж, то аналіз припиняють до усунення проблеми та проводять перекалібрування спектрометра.

Для перевірки міжелементних та фонових чинників корекції аналізують контрольні зразки перед початком, наприкінці та періодично під час аналізу експериментальних проб. Результати аналізу мають бути в межах двох стандартних відхилень середнього значення. В іншому випадку припиняють аналіз, усувають проблему та перекалібровують спектрометр.

В основу визначення вмісту розчинних у воді хімічних елементів, в тому числі важких металів, покладено метод стандартних домішок, який полягає у приготуванні тест-стандартних зразків з матрицею проби, яка аналізується, додаванням відомих кількостей тест-стандартного розчину з одним або кількома (з найбільшим вмістом очікуваних хімічних елементів у аналізуемій пробі) елементами. Цей метод компенсує вплив компонентів проби, що посилюють або зменшують сигнал, який реєструється спектрометром.

При проведенні безпосереднього аналізу профільтрованої проби води (див. вище) беруть дві однакові аліквоти проби об'ємом V_x . До першої аліквоти (позначеної як A) додають відносно малий об'єм (декілька см^3) стандартного розчину з вмістом хімічного елемента, який визначається ($C_{ст.}$). Друга аліквота (позначається як B) не містить робочого стандартного розчину.

Вимірюють аналітичні сигнали від аліквот A і B і корегують їх з урахуванням сигналу від неробочого «сліпого» розчину на реактиви.

Проведення розрахунків:

Вміст розчиненого хімічного елемента у воді обчислюють за формулою:

$$C_x = \frac{S_A \cdot V_{ст.} \cdot C_{ст.}}{(S_A - S_B) \cdot V_x}$$

де C_x – вміст розчинного хімічного елемента в пробі, яка аналізується, мкг/дм^3 ;

$C_{ст.}$ – вміст розчинного хімічного елемента в робочому стандартному розчині, мкг/дм^3 ;

S_A – величина аналітичного сигналу в розчині A за вирахуванням сигналу неробочої проби;

S_B – величина аналітичного сигналу в розчині B за вирахуванням сигналу неробочої проби;

$V_{СТ}$ – об'єм домішки робочого стандартного розчину, см^3 ;

V_X – об'єм аліквотних частин проби, яка аналізується, см^3 .

Вибирають $V_{СТ}$ і $C_{СТ}$ такими, щоби S_A був приблизно в два рази більший ніж S_B . Краще також щоби $V_{СТ}$ був менший за V_X та, відповідно, $C_{СТ}$ більший за C_X . Це дозволяє запобігти надлишковому розведенні матриці проби.

Для того, щоб результати аналізу були надійними, необхідно дотримуватися наступних умов:

1. аналітичний сигнал має бути лінійним;
2. розчинний хімічний компонент стандарту повинен бути такий же, як і в пробі, що аналізується;
3. побічні впливи мають бути постійними у всьому робочому діапазоні;
4. аналітичний сигнал потрібно корегувати з урахуванням усіх завад.

При визначенні загального вмісту хімічних елементів непрофільтрованих 100 см^3 підкисненої $0,5 \text{ см}^3$ нітратною кислотою ($\rho=1,40 \text{ г/см}^3$) проби, яка аналізується, випарюють майже до сухого стану, не допускаючи повного випаровування рідини на дні склянки (це може призвести до зниження результатів).

У разі наявності нерозчинного матеріалу додають трохи деіонізованої води ($2-3 \text{ см}^3$) і повторюють обробку.

Залишок розчиняють в 1 см^3 нітратної кислоти ($\rho=1,40 \text{ г/см}^3$) та $10-15 \text{ см}^3$ деіонізованої води, доводять цією водою до об'єму 100 см^3 та розчин аналізують як описано вище.

Деякі хімічні елементи або їх сполуки (наприклад Стибій, Силіцій, Станум, Титан, алюмінію оксид) лише частково розчиняються за даної процедури і це необхідно враховувати при інтерпретації результатів аналізу.

2. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ

Хроматографія (грецьк. *chroma* – колір та *graho* – пишу) – розповсюджений аналітичний метод розділення, ідентифікації, очищення та визначення вмісту (концентрації) досліджуваних речовин за використання в залежності від мети і задач дослідження різноманітних детекторів. Прилади, які використовуються в хроматографії називаються *хроматографами*.

Методи хроматографії (газової, газорідинної і рідинної) базуються на різній взаємодії компонентів досліджуваної суміші речовин з рухомою (газ або рідина) і нерухомою (рідина або тверде тіло) фазами. В процесі хроматографії рухома фаза, яка містить досліджувану суміш речовин, переміщується через нерухому. При цьому відбувається розділення речовин суміші внаслідок *сорбції* (лат. *sorbere* – поглинати) її компонентів нерухомою фазою з наступним вимиванням, що відбувається з різною швидкістю. Розділені речовини реєструються відповідними детекторами.

Розділення речовин в хроматографії відбувається за використання колонок – трубок, що заповнені нерухомою фазою (сорбентом), через яку аналізована суміш речовин проходить в потоці газоподібного або рідкого носія, а в тонкошаровій хроматографії (ТШХ) нерухомою фазою слугує тонкий шар адсорбенти, який наносять на пластинки або спеціальний хроматографічний папір.

За механізмом розділення досліджуваних речовин методи хроматографії поділяються на такі види: 1) адсорбційна хроматографія (розділення речовин відбувається на поверхні адсорбенту в умовах рівноваги між рухомою і нерухомою фазами); 2) розподільна хроматографія (базується на розділенні речовин за рахунок різниці в їхньому розподіленні між рухомою і нерухомою фазами, які знаходяться в контакті); 3) іонообмінна хроматографія (розділення речовин на основі обмінної адсорбції в умовах рівноваги між електролітом, який є рухомою фазою, та іонообмінним адсорбентом); 4)

афінна хроматографія (базується на здатності молекул досліджуваної речовини специфічно і зворотно взаємодіяти з речовинами, основною властивістю яких є висока ступінь спорідненості до досліджуваної речовини); 5) обернено-фазова хроматографія (нерухома фаза – неполярна, а рухома – полярна (здатність її сполук проявляти електризованість), що спричинює зв'язування певних речовин, а ті які не зв'язалися – видаляються певним розчинником); 6) проникна (гель-фільтраційна або молекулярно-ситова) хроматографія (розділення речовин за допомогою гелів (дисперсних систем), яке ґрунтується на різниці в розмірах молекул, що визначені їхньою молекулярною масою).

Основні типи детекторів, які застосовуються в хроматографії: спектрофотометричні, спектрофлуориметричні, полум'яно-іонізаційні, термоіонні, електронного захоплення, атомно-емісійні, мас-селективні, фотоіонізаційні, постійної швидкості рекомбінації, теплопровідності, кулонометричні та інші.

Лабораторна робота 2.1. Ідентифікація та визначення жирнокислотного складу тваринних жирів і рослинних олій методом газової хроматографії.

Принцип методу. Однією з основних ідентифікаційних характеристик жирів є їх жирнокислотний склад. Жирні кислоти – це органічні сполуки, які становлять собою вуглеводневі ланцюги з кінцевою карбоксильною групою ($-\text{COOH}$). Вони (крім вільних жирних кислот) входять до складу ліпідів. Саме за жирнокислотним складом можна виявити фальсифікацію жирів (смальцю, масла, маргаринової продукції, рослинних олій тощо).

Якісний і кількісний жирнокислотний склад, кількість транс-ізомерів у жирах і оліях визначається методом газової хроматографії. Метод базується

на перетворенні жирних кислот триацилгліцеролів у метилові етери жирних кислот та газохроматографічному аналізі.

Матеріали для дослідження: жири тваринні та рослинні олії.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: газовий хроматограф з полум'яно-іонізаційним детектором і програмним забезпеченням температури; високополярна капілярна колонка, наприклад, *SPTM-2560, 100m × 0,25mm ID; 0,20μm film («Supelco»)*; мікрошприц або мікропіпетка об'ємом 10 мм³; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; генератор Гідрогену; дистильована вода; гексан; натрій хлористий, насичений розчин; безводний натрію сульфат; натрію гідроксид, метиловий розчин 0,5 н.; бору трифторид, метиловий розчин 0,5 н.; ізооктан; стандартна суміш метилових етерів жирних кислот, наприклад *Supelco TM 37 Compone FAME Mix, 100 mg Neat*; гелій газоподібний стиснений 99,999 %; колба конічна об'ємом 100 см³; зворотний холодильник; воронка лабораторна; піпетки мірні об'ємом 10 см³; віали з темного скла об'ємом 4 см³.

Хід роботи:

Включають газовий хроматограф в електромережу. Визначають параметри аналізу згідно з «Інструкцією щодо експлуатації». Дають приладу вийти на режим і прогрітися 30 хв.

Проби відбирають відповідно до існуючого правила відбору проб сільськогосподарської продукції та харчових продуктів для визначення жирнокислотного складу тваринних жирів і рослинних олій.

Дослідну пробу (100–250 мг) ретельно перемішують та вміщують у колбу ємністю 50 см³. Додають 4 см³ метанольного розчину натрію гідроксиду. Зворотний холодильник приєднують до колби і кип'ятять зі зворотним холодильником до зникнення крапельок жиру, обережно помішуючи вміст колби з інтервалом від 30 с до 1 хв, щоб запобігти формуванню кільця з натрію гідроксиду на стінках колби. Ця процедура,

звичайно, потребує 10 хв, але іноді до 1 год. Додають 5 см³ метанольного розчину бору трифториду через верхню частину холодильника. Продовжують кип'ятіння від 30 до 60 хв. Додають у киплячу суміш через верхню частину холодильника від 1 до 3 см³ ізооктану. Знімають колбу з джерела тепла та від'єднують зворотний холодильник.

Негайно, не даючи колбі охолонути, додають 20 см³ розчину натрію хлориду. Колбу закривають корковою пробкою та інтенсивно струшують упродовж 15 с. Додають ще насичений розчин натрію хлориду, щоб довести рівень суміші до горловини колби. Дають двом фазам можливість розділитися. Від 1 до 2 см³ верхнього гексанового шару переносять у флакон об'ємом 4 см³ і додають невелику кількість зневодненого натрію сульфату для повного видалення залишків води.

Проводять аналіз метилових етерів жирних кислот методом газової хроматографії.

Проводять холостий дослід з *n*-гептаном або гексаном. У холостому досліді не повинно бути знайдено ніяких піків, окрім розчинника. Це випробування повторюють після кожних десяти проб.

Перед проведенням аналізу метилових етерів жирних кислот проби, що аналізується, проводять хроматографічне дослідження стандартної суміші метилових етерів жирних кислот (*Supelco TM 37 Compone FAME Mix, 100mg Neat*). Ця процедура необхідна для того, щоб перевірити чутливість та ефективність розділення хроматографічної колонки, а також для проведення ідентифікування отриманих хроматографічних піків компонентів проби.

Потім проводять аналіз метилових етерів жирних кислот проби. Для цього використовують мікрошприц, за допомогою якого відбирають 1 мм³ розчину метилових етерів жирних кислот і вводять у колонку газового хроматографа. Відбувається хроматографічний аналіз. Після проведення аналізу, записується хроматограма поділу компонентів. За нею визначають

піки метилових етерів. Ідентифікацію проводять за допомогою стандартних зразків метилових етерів жирних кислот.

Проведення розрахунків:

Використовують метод внутрішньої нормалізації, тобто вважають, що сума площин усіх піків компонентів проби, які представлені на хроматограмі, становить 100 %. Площа піків компонентів (S) в квадратних міліметрах (мм^2) обчислюють за формулою:

$$S = h \cdot a_{0,5},$$

де h – висота піку (мм);

$a_{0,5}$ – ширина, яка виміряна на половині висоти (мм).

Масову частку жирної кислоти у відсотках обчислюють за формулою:

$$C_i = \frac{S_i}{\sum_i S_i} \cdot 100,$$

де C_i – відсоткова масова частка i -компонента (i -ї жирної кислоти);

S_i – площа піку i -го метилового етеру жирної кислоти (мм^2);

$\sum_i S_i$
 i – сума площин усіх піків на хроматограмі (мм^2);

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки (%).

У певних випадках, наприклад, при наявності жирних кислот із кількістю атомів Карбону менше 8 або жирних кислот із вторинними групами, при необхідності отримання результатів із найвищою ступеню точності тощо, треба використовувати коригувальні поправки, щоби перетворити відсоткове відношення площ піків у відсоткове відношення мас компонентів суміші метилових етерів жирних кислот.

Коригувальні поправки визначають за допомогою хроматограми, яку отримують у результаті аналізу еталонної суміші метилових етерів жирних

кислот відомого складу, проведеного в умовах, які ідентичні умовам аналізу досліджуваної проби.

Для такої еталонної суміші метилових етерів жирних кислот відсоткове відношення маси i -го компонента обчислюють за формулою:

$$C_{e_i} = \frac{m_i}{\sum_i m_i} \cdot 100,$$

де C_{e_i} – відсоткове відношення маси i -го компонента в еталонній суміші;

m_i – маса i -го компонента в еталонній суміші;

$$\sum_i m_i$$

i загальна маса всіх компонентів еталонної суміші;

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки (%).

З хроматограм еталонної суміші обчислюють відсоткове відношення площ піків для i -го компонента за формулою:

$$C_{i_s} = \frac{S_i}{\sum_i S_i} \cdot 100,$$

де C_{i_s} – відсоткове відношення площ піків для i -го компонента еталонної суміші;

S_i – площа під піком, що відповідає i -му компоненту еталонної суміші;

$$\sum_i S_i$$

i сума площ усіх піків еталонної суміші;

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки (%).

Після цього коригувальну поправку обчислюють за формулою:

$$K_i = \frac{m_i \cdot \sum_i S_i}{S_i \cdot \sum_i m_i}.$$

Звичайно коригувальну поправку виражають згідно такої для метилового етеру жирної кислоти, яка містить 16 атомів Карбону (K_{C16}), тобто обчислюють відносну коригувальну поправку:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}.$$

Вміст кожного i -го компонента в пробі, яка аналізується, що виражений у відсотковому відношенні до маси метилових етерів, обчислюють за формулою:

$$C_{im} = \frac{K'_i \cdot S_i}{\sum_i (K'_i \cdot A_i)} \cdot 100.$$

У випадках, коли не всі метилові етери жирних кислот можуть бути підраховані або коли необхідно визначити абсолютну кількість жирних кислот у пробі, слід скористатися внутрішнім стандартом. Часто використовують жирні кислоти з 5, 15 чи 17 атомів Карбону. Для внутрішнього стандарту, якщо треба, визначають коригувальні поправки.

Відсоткове відношення маси i -го компонента до маси метилових етерів обчислюють за формулою:

$$C_{im} = \frac{m_s \cdot K'_i \cdot S_i^0}{m \cdot K'_s \cdot S_s} \cdot 100,$$

де C_{im} – відсоткове відношення маси i -го компонента до маси етилових етерів;

S_i – площа під піком, що відповідає i -му компоненту;

S_s – площа під піком, що відповідає внутрішньому стандарту;

K'_i – коригувальна поправка для i -го компонента (відносно K_{C16});

K'_s – коригувальна поправка для внутрішнього стандарту (відносно K_{C16});

m – маса дослідної проби (мг);

m_s – маса внутрішнього стандарту (мг);

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки (%).

При необхідності визначити масову концентрацію метилового етеру жирної кислоти в пробі, яка аналізується (мг/кг проби або мкг/кг проби), необхідно провести відповідні перерахунки.

За неможливості вирахувати площу піків (вони мають малу ширину і відсутній інтегратор) можна скористатися тільки висотою піків (мм), хоча цей прийом дає меншу точність.

Розрахунки проводять до другого десяткового знаку з наступним округленням результату до першого десяткового знаку.

За результат аналізу приймають середнє арифметичне результатів двох-трьох послідовних визначень.

Лабораторна робота 2.2. Визначення вмісту ретинолу (вітаміну А) в тваринних продуктах методом високоефективної рідинної хроматографії.

Принцип методу. Методика визначення ретинолу (вітаміну А) в пробах тваринної продукції, наприклад вершковому маслі, сухому молоці, яйцях, печінці базується на омиленні розчину проби з подальшою екстракцією н-гексаном неомиленої частини та наступним промиванням екстракту дистильованою водою, концентрацією екстракту та розведенням сухого залишку в рухомій фазі з подальшим визначенням вмісту вітаміну методом високоефективної хроматографії з діодноматричним детектором.

Матеріали для дослідження: тваринна продукція (наприклад, вершкове масло, сухе молоко, яйця, печінка).

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: хроматограф рідинний з діодноматричним детектором; ротаційний випарник; терези аналітичні 2-го класу точності з максимальною межею зважування 200 г; гомогенізатор; апарат для струшування типу «Вортекс»; ультразвукова баня; баня водяна; термометр; кристалічний ретинол (вітамін А), аналітичний

стандарт; ацетонітрил; метанол; 2-пропанол; етанол; гексан; безводний натрію сульфат; калію гідроксид; аскорбінова кислота; дистильована вода; циліндр мірний ємністю 250 см³; колби конічні ємністю 250 см³; колби круглодонні ємністю 50 см³, 100, 250 і 500 см³; колби гостродонні ємністю 50 см³; ділительні лійки ємністю 250, 500 см³; віали з темного скла об'ємом 1,5–2 см³; одноразові шприци пластикові; одноразові мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм; мікропіпетки об'ємом 5 см³, 1–0,1; 0,2–0,02 см³; фільтрувальний папір (синя стрічка).

Хід роботи:

Включають рідинний хроматограф в електромережу. Встановлюють параметри аналізу згідно з «Інструкцією щодо експлуатації». Дають приладу вийти на режим і прогрітися 30 хв.

При підготовці проводять наступні роботи: відбір зразків проб, приготування розчинів та матеріалів, підготовка до хроматографічних вимірювань, пробопідготовка (відбір наважки, підготовка до омилення, омилення, екстракція, випаровування та розведення).

При омиленні проб необхідно врахувати характерні особливості зразків для дослідження та очікуваний вміст вітаміну, тому що це необхідно для визначення маси наважки проби. Можна про демонструвати процес підготовки проби до омилення на прикладі вершкового масла: зважують 2–5 г проби, додають 50 см³ розчинника (метанолу або етанолу), додають 0,25 г антиоксиданту (аскорбінової кислоти), а вже потім 5 см³ етанольного розчину КОН. Важливим моментом є те, що антиоксидант потрібно вносити перед додаванням 70 %-вого етанольного розчину калію гідроксиду (КОН).

У подальшому проводять омилення наступним чином. На водяну баню з оборотним холодильником встановлюють круглодонну колбу з наважкою, антиоксидантами, розчинником та калію гідроксидом, а також обов'язково кладуть в колбу кипілку (маленькі уламки керамічного хімічного посуду) та

звертають увагу на температуру кипіння розчинника (метанолу або етанолу). Встановлюють термометр. Із моменту закипання проби проводять відлік часу, який повинен становити при масі наважки 2–5 г – 45 хв, 10–30 г – 60 хв і т. п. Після омилення і охолодження проби на поверхні омиленої суміші не повинно бути краплин жиру, в іншому випадку омилення необхідно продовжити з додатковим додаванням калію гідроксиду. Після омилення, колбу з пробєю охолодити під струменем холодної води до кімнатної температури.

Після цього проводять екстракцію ретинолу (вітаміну А). Охолоджену пробу переносять до ділильної лійки та додають таку кількість води, щоб у кінцевому розчині співвідношення води до спирту становило 1:1. При цьому водою необхідно попередньо змити залишки з колби. Екстрагують вітамін А гексаном 2–4 рази в об'ємах, що коливаються від 100 до 200 см³, залежно від кількості омиленого розчину. Об'єднані екстракти промивають дистильованою водою в об'ємі 50–100 см³ декілька разів. Промитий екстракт пропускають через безводний натрію сульфат для усунення залишків води і випарюють екстракт на ротаційному випарнику до сухого залишку при температурі 35–40 °С.

На наступному етапі сухий залишок розчинюють у відповідній кількості розчинника, що входить до складу рухомої фази для хромато-графічного дослідження та проводять попередню очистку, використавуючи мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм. Потім фільтрат переносять до віали.

У подальшому в ході дослідження проб проводять визначення ретинолу (вітаміну А) методом вискоєфективної хроматографії з фотодіодноматричним детектором. Умови хроматографування: рухома фаза – метанол:2-пропанол:вода (87,5:5:7,5), аналітична колонка з оберненою фазою Wide Pore C18 5 мкм; 15 см×4,6 мм («Supelco»), предколонка 5 мкм, 2 см×4 мм того ж виробника; температура термос-тата колонки 30 °С, ін'єкційний об'єм – 10 мм³, довжина хвилі – 325 нм.

Приготування стандартних розчинів ретинолу (вітаміну А).

За відсутності стандартних розчинів ретинолу (вітаміну А) їх готують самостійно. Для приготування основного стандартного розчину наважку 10 мг кристалічного ретинолу вносять у мірну колбу ємністю 100 см³, що містить 50 см³ гексану. Після ретельного перемішування в цю колбу додають ще гексан до мітки і теж перемішують. В отриманому основному стандартному розчині концентрація ретинолу буде 0,1 мг/см³.

З основного стандартного розчину (0,1 мг/см³) готують методом розведення необхідні стандартні розчини – 10 мкг/см³, з нього – 1 мкг/см³ і т.д.

Проведення розрахунків:

Масову концентрацію ретинолу (вітаміну А) обчислюють за формулою:

$$C_x = \frac{C_{ст.} \cdot V_x \cdot V_{іст.}}{m \cdot V_{іх} \cdot 1000} \cdot \frac{S_x}{S_{ст.}} \cdot 100,$$

де C_x – масова концентрація ретинолу в пробі, яка аналізується (мг/100 г проби);

$C_{ст.}$ – масова концентрація ретинолу в стандарті (мкг/см³);

V_x – загальний кінцевий об'єм екстракту проби, який аналізується (см³);

$V_{іст.}$ – об'єм розчину стандарту, який вводиться в інжектор хроматографа (мм³);

m – маса проби, яка взята для аналізу;

$V_{іх}$ – об'єм екстракту проби, який вводиться в інжектор хроматографа (мм³);

S_x – площа піку на хроматограмі проби, яка аналізується (мм²);

$S_{ст.}$ – площа піку на хроматограмі стандарту (мм²);

100 – коефіцієнт перерахунку масової концентрації на 100 г проби;

1000 – коефіцієнт перерахунку мікрограм у міліграми.

Лабораторна робота 2.3. Ідентифікація та визначення вмісту афлатоксинів В₁, В₂, G₁ і G₂ у зерні методом двомірної тонкошарової хроматографії.

Принцип методу. Афлатоксини відносяться до найзагрозливіших груп мікотоксинів – вторинних метаболітів мікроскопічних пліснявих грибів. Вони, зокрема, найбільш продукуються грибами (*Aspergillus flavus* і *Aspergillus parasiticus*). За хімічною будовою афлатоксини відносяться до класу полікетидів.

В основну групу афлатоксинів входять В₁, В₂, G₁ і G₂, а до допоміжної групи ще більше десяти сполук, які є їх метаболітами або похідними основної групи (M₁, M₂, В_{2а}, G_{2а}, G_{M1}, P₁, Q₁ та ін.).

Матеріали для дослідження: зерно.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: стандартні пластинки (150×40 мм) фірми «Silufol» (Чехія); терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; мікроподрібнювач зерна (кавомолка); водяна баня; пристрій для упарювання (ротаційний випарник); апарат для струшування типу «Вортекс»; витяжна і сушильна шафи; хроматографічні камери; дистильована вода; натрію хлорид; безводний натрію сульфат; свинцю ацетат; ацетон; бензол; гексан; хлороформ; ацетонітрил; силікагель; високоочищені кристалічні афлатоксини В₁, В₂, G₁ і G₂; фільтрувальний папір (синя стрічка) та все необхідне для фільтрування; плоскодонні колби ємністю 250 см³; ділильна лійка ємністю 100 см³; грушоподібна колба ємністю 250 см³; мірні колби ємністю 100 см³; лійки; хімічні склянки ємністю 50 і 100 см³; мірні циліндри ємністю 50 і 100 см³; пробірки об'ємом 5 см³; мікрошприц або мікропіпетка об'ємом 20 мм³.

Хід роботи:

Включають рідинний хроматограф в електромережу. Встановлюють параметри аналізу згідно з «Інструкцією щодо експлуатації». Дають приладу вийти на режим і прогрітися 30 хв.

Зразки відбирають відповідно до існуючих правил відбору проб сільськогосподарської продукції та харчових продуктів для визначення мікотоксинів.

Наважку мілкоподрібненої проби масою 25 г поміщають у плоскодонну конічну колбу ємністю 250 см³, додають 25 см³ 10 %-го розчину натрію хлориду і ретельно перемішують. Потім додають 100 см³ ацетону і розміщають на апараті для струшування протягом 30 хв. Одержану суміш фільтрують через паперовий складчастий фільтр і відбирають 50 см³ фільтрату. Для очищення отриманого екстракту від білків, ліпідів і пігментів до цих 50 см³ фільтрату додають 20 см³ 15 %-го розчину свинцю ацетату та 30 см³ дистильованої води. Ретельно перемішують і залишають стояти 10 хв в темно-му місці при кімнатній температурі. Осад, що утворився, фільтрують через паперовий складчастий фільтр і відбирають 80 см³ фільтрату. Його додають у ділильну лійку і промивають 2 рази по 30 см³ гексаном. Гексановий шар відкидають. У подальшому проводять переекстракцію: 1-й раз у 30 см³ хлороформу, а другий – в 45 см³ у суміші хлороформ:ацетон (3:1). Об'єднані екстракти поміщають у плоскодонну колбу ємністю 250 см³, додають 5 г безводного натрію сульфату, ретельно струшують (вручну) і залишають стояти в темному місці 30 хв. У подальшому розчин фільтрують у грушоподібну колбу через шматочок вати, який вкладений в хімічну лійку. Отриманий хлороформний розчин упарюють на ротаційному випарнику до об'єму 1 см³. Далі отриманий очищений екстракт доочищують зі застосуванням хроматографічної колонки. Для цього на дно скляної колонки (довжина 30 см, діаметр 15 мм) наливають суспензію силікагелю (2 г силікагелю в 20 см³ хлороформу), дають можливість стекти хлороформу і зверху насипають шар товщиною 2 см безводного натрію сульфату, потім у

колонку вносять хлороформний екстракт проби, що аналізується. Коли хлороформ повністю стече через колонку пропускають 60 см³ суміші хлороформ:ацетон (9:1). Отриманий елюат упарюють насухо на ротаційному випарнику, залишок розчиняють у 2 см³ хлороформу, фільтрують через паперовий фільтр у пробірку об'ємом 5 см³ і обдувають у струмі азоту, а залишок розчиняють у 400 мм³ хлороформу. Це і є проба для аналізу.

При проведенні двовимірної тонкошарової хроматографії для ідентифікації та визначення вмісту афлатоксинів В₁, В₂, G₁ і G₂ рекомендовано як нерухому фазу обирати стандартні пластинки фірми «Silufol». Застосовуються 2 рухомі фази: рухома фаза I – суміш діетиловий етер:метанол:вода (94:4,5:1,5), а рухома фаза II – суміш хлороформ:ацетон:вода (90:9:1).

У хроматографічні камери I і II наливають відповідні рухомі фази шаром не вище 1 см. У ці розчини занурюють край фільтрувального паперу, який розташовують вертикально біля задньої стінки камери. Камери накривають скляними кришками і залишають на 20–30 хв для насичення газової фази в них парами рухомої фази.

Хроматографічну платівку розмічують наступним чином: на відстані 1,5 см від нижнього та лівого країв пластинки обережно без руйнування шару нерухомої фази наносять олівцем лінії, які будуть лініями старту. З верхнього та правого країв на відстані 2 см наносять такі ж лінії – це лінії фінішу.

У подальшому в нижній лівий кут вище, але близько до перетину ліній, наносять маленькими порціями 20 мм³ екстракту проби, що аналізується, а у верхній лівий кут, трохи вище перетину ліній, 20 мм³ робочого стандартного розчину афлатоксинів. Їх приготування див. нижче. Виниклі плями після нанесення кожної порції висушують на повітрі.

Після нанесення експериментального зразка і робочих стандартів афлатоксинів на хроматографічну платівку, її занурюють у підготовлену (насичену парами) хроматографічну камеру I. Коли фронт рухомої фази

досягне лінії фінішу, хроматографічну платівку виймають із камери I та висушують на повітрі до зникнення запаху розчинника.

Далі платівку повертають так, щоб лівий край став нижчим. У цьому положенні її занурюють у хроматографічну камеру II. Коли в ній фронт рухомої фази II досягне другої лінії фінішу, платівку виймають з камери II і висушують на повітрі до зникнення запаху розчинника.

Висушену пластинку аналізують у довгохвильовому ультрафіо-летовому світлі (максимальна довжина хвилі 360–365 нм). Виявлене світіння флюоресценції плям експериментального зразка і робочих стандартів (для афлатоксинів B₁, B₂ синій, а G₁ і G₂ – синьо-зелений колір) свідчить про наявність афлатоксинів.

Приготування стандартних розчинів афлатоксинів

Для ідентифікації афлатоксинів B₁, B₂, G₁ і G₂ і визначення їх вмісту в пробі, що аналізується, готують стандартні розчини цих афлатоксинів. Для цього використовують високоочищені кристалічні афлатоксини. Наважку по 1 мг кожного афлатоксину B₁, B₂, G₁ і G₂ поміщують у мірну колбу ємністю 100 см³ і сумішшю бензол:ацето-нітрил (98:2). Концентрація афлатоксинів в основних стандартних розчинах становить 10 нг/мм³. Із них готують робочі стандартні розчини (наприклад, 0,1 нг/см³; 0,2 і 0,5 нг/см³) за рахунок розведення невеликого об'єму (наприклад, 0,5 см³) основних стандартних розчинів сумішшю бензол:ацетонітрил (98:2). Концентрацію робочих стандартних розчинів підбирають експериментально за тією умовою, що афлатоксини чітко проявляються на хроматограмі.

Проведення розрахунків

Кількість афлатоксинів B₁, B₂, G₁ і G₂ у відповідних плямах проб, що аналізуються, визначають шляхом порівняння інтенсивності їх флюоресценції з такою плям (при їх однаковому розмірі) робочих стандартних розчинів афлатоксинів. Це робиться візуально, але зі значно більшою точністю при використанні спеціальних високочутливих приладів (рідерів).

Вміст афлатоксинів у пробах, що аналізуються, обчислюють за формулою:

$$C_x = \frac{A \cdot 1000}{m},$$

де C_x – вміст певного афлатоксину в пробі, яка аналізується (мкг/кг);

A – кількість афлатоксину, яка знайдена шляхом порівняння розміру та інтенсивності плям проби і стандартного розчину (мкг);

m – наважка аналізованої проби (г);

1000 – коефіцієнт перерахунку мкг/г проби в мкг/кг проби.

Лабораторна робота 2.4. Ідентифікація та визначення афлатоксинів B_1 , B_2 , G_1 і G_2 у зерні методом високоефективної рідинної хроматографії.

Принцип методу. Для більш ретельного визначення вмісту афлатоксинів B_1 , B_2 , G_1 і G_2 у порівнянні з методом двовимірної тонкошарової хроматографії використовується високоефективна рідинна хроматографія з імуноферментним способом очищення афлатоксинів і флуоресцентного детектора.

Методика ідентифікації та визначення вмісту афлатоксинів B_1 , B_2 , G_1 і G_2 в сировині та харчових продуктах методом високоефективної рідинної хроматографії з використанням флуоресцентного детектора базується на вимірі та порівнянні інтенсивності флуоресценції проб, які аналізуються, з пробами-стандартами.

Матеріали для дослідження: зерно.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: рідинний хроматограф високого тиску з флуоресцентним детектором; імуноафінна колонка для очищення екстрактів афлатоксинів; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г, мікроподрібнювальним пристроєм (кавомолка); апарат для струшування типу «Вортекс»;

дистильована вода; маніфолд із вакуумним насосом; подрібнювач (блендер); натрію хлорид; целіт (для жирових продуктів); хлороформ (для жирових продуктів); фосфатний буфер розчин (PBS); стандартні розчини афлатоксинів у метанолі; бензол; ацетонітрил; метанол; мікрошприц або мікропіпетка об'ємом 10 мм³; піпетки, об'єм дозування 1–10 см³; лабораторні склянки ємністю 250 см³; конічні колби ємністю 250 см³; конічні колби ємністю 500 см³ (для жирових продуктів); мірні колби ємністю 100 см³, 200 і 250 см³; пробірки об'ємом 5–10 см³; фільтрувальний папір (синя стрічка) та все необхідне для фільтрування; вата.

Хід роботи:

Включають рідинний хроматограф в електромережу. Встановлюють параметри аналізу згідно з «Інструкцією щодо експлуатації». Дають приладу вийти на режим і прогрітися 30 хв.

Проби відбирають відповідно до існуючих правил відбору проб сільськогосподарської продукції та харчових продуктів для визначення мікотоксинів.

Зважити 50 г мілкоподрібненої проби та 4 г натрію хлориду, помістити в об'єм 1 дм³ блендера (стійку до розчинників). Додати 250 см³ суміші метанол:дистильована вода (60:40), накрити і пере-мішувати 1 хв при високій швидкості (на шейкері протягом 15 хв). Розвести екстракт у 250 см³ дистильованої води. Обережно і добре перемішати (вручну). Негайно після перемішування, відфільтрувати приблизно 25–50 см³ екстракту проби через фільтр (синя стрічка). Відібрати 10 см³ фільтрату (еквівалентно 1 г проби) до скляного шприца для пропускання через імуноафінну колонку, яка містить в собі антитіла до мікотоксинів B₁, B₂, G₁ і G₂.

Імуноафінна колонка має набути температури оточуючого середовища перед використанням. Для наступного етапу процедури потрібно зняти заглушку з дна колонки і пропустити отриманий об'єм проби крізь імуноафінну колонку зі швидкістю потоку 2–3 см³/хв. Повільний постійний

тиск є визначальним фактором для «закріплення» афлатоксинів на антитілах. Об'єм проби має бути 10 см^3 при використанні екстракту з метанолом (еквівалентно 1 г оригінальної сировини).

Помістити 50 г мілкоподрібненої проби та 25 г целіту в конічну колбу на 500 см^3 . Додати 250 см^3 хлороформу та 25 см^3 дистильованої або деіонізованої води, закрити корком та перемішувати протягом 30 хв. Профільтрувати через фільтр (синя стрічка) і зібрати 20 см^3 фільтрату. Відібрати 10 см^3 фільтрату і випарити до сухого осаду на ротаційному випарнику при $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Осад розчинити в 5 см^3 метанолу і довести об'єм до 50 см^3 дистильованою водою. Перемістити весь розчин (еквівалентний 2,0 г проби) в ємність скляного шприца для пропускання через іонообмінну колонку. Об'єм проби має бути 50 см^3 при використанні екстракту з хлороформом (еквівалентно 2 г проби).

Додати 20 см^3 розчину фосфатного буфера PBS (pH 7,2) в ємність скляного шприца і пропустити через імуноафінну колонку зі швидкістю потоку $5 \text{ см}^3/\text{хв}$.

Помістити віалу прямо під колонкою. Відібрати 1 см^3 метанолу для хроматографії (елюент) у скляний шприц. Елюювати афлатоксини з колонки в скляну віалу шляхом пропускання метанолу крізь колонку зі швидкістю потоку 1 крапля в секунду. Рекомендується повторення проходження потоку крізь колонку (зміна напрямку потоку) тричі, щоб відбулася повна денатурація моноклональних антитіл і послідовне звільнення афлатоксинів у розчин. Наступний етап елюювання – набрати 1 см^3 дистильованої води в ємність скляного шприца, пропустити крізь колонку та зібрати у віалу до загального об'єму 2 см^3 , після чого аналізують на високоефективному рідинному хроматографі за умов: об'єм введених проб 20 мм^3 , рухома фаза – ацетонітрил:вода:метанол (2:6:2), що містить калію бромід у концен-трації $0,12 \text{ г/дм}^3$ і $0,2 \text{ см}^3$ концентрованої нітратної кислоти в 1 дм^3 , швидкість потоку – $1 \text{ см}^3/\text{хв}$; детектор флюоресценції, довжина хвилі збудження ($\lambda_{\text{збуд}}$)

дорівнює 360 нм, а довжина хвилі випромінювання ($\lambda_{\text{випр.}}$) для афлатоксинів В₁ і В₂ – 425 нм (синя флюоресценція), а G₁ і G₂ – 450 нм (синьо-зелена флюоресценція). У випадку одночасного визначення афлатоксинів, як В₁, В₂, так і G₁, G₂ використовують, як правило $\lambda_{\text{випр.}} = 440$ нм.

При використанні цього методу чутливість визначення В₁ і В₂ є на рівні 1–2 мкг/кг, а G₁ і G₂ – 0,1–1,0 мкг/кг. Передусім це залежить від аналітичної колонки і ступеня очищення проб.

При виконанні аналізу на хроматограмі визначають положення піків афлатоксинів В₁, В₂, G₁ і G₂, і їх порівнюють за часом виходу (для ідентифікації) та інтенсивністю флюоресценції (для визначення вмісту) з такими, які отримані для робочих стандартів цих афлатоксинів.

Приготування стандартних розчинів афлатоксинів

Для приготування основного стандартного розчину афлатоксинів В₁, В₂, G₁ і G₂ використовують одним із двох способів:

1. В мірну колбу ємністю 100 см³ додають приблизно 50 см³ метанолу і 0,5 см³ наявного стандарту кожного афлатоксину, в якому їх концентрація становить 0,1 мкг/см³. В отриманому основному стандартному розчині концентрація кожного виду афлатоксину буде 5 нг/см³ зі загальним об'ємом 100 см³.

2. За відсутності стандартних розчинів афлатоксинів їх готують самостійно. Для цього наважку 0,5 мкг кожного з них поміщають у мірну колбу ємністю 100 см³, в яку попередньо налито приблизно 50 см³ метанолу. Після ретельного перемішування в цю колбу додають ще метанол до мітки і теж перемішують. В отриманому основному стандартному розчині кожного афлатоксину їх концентрація буде 5 нг/см³ зі загальним об'ємом 100 см³.

З основного стандартного розчину (5 нг/см³) готують метано-ловий розчин концентрацією 2,5 нг/см³ зі загальним об'ємом 10 см³. Для цього відбирають аліквоту основного стандартного розчину 5 см³, додають у пробірку з притертим корком, об'єм якої складає не менше 10 см³, в яку

вносять ще 5 см³ метанолу. Отримана концентрація кожного афлатоксину в такому стандартному розчині 1–2,5 нг/см³ зі загальним об'ємом 10 см³.

При використанні цього стандартного розчину 1 аналогічним способом отримують стандартний розчин 2 (концентрація афлатоксинів 1,25 нг/см³), а з нього стандартний розчин 3, який містить 1 нг/см³. Для цього аліквоту стандартного розчину 2 в об'ємі 2 см³ додають до 8 см³ метанолу. Стандартний розчин 4 афлатоксинів, який містить 0,5 нг/см³, отримують наступним чином: аліквоту 1 см³ стандартного розчину 3 додають в пробірку, до якої наливають 9 см³ метанолу.

Основний стандартний розчин афлатоксинів В₁, В₂, G₁ і G₂ зберігають в холодильнику при температурі нижче 0 °С. Термін його придатності – до 1 року.

Проведення розрахунків

Обчислення концентрації кожного афлатоксину В₁, В₂, G₁ і G₂ проводять за формулою:

$$C_x = (C \cdot 2/1000) \cdot 1000,$$

де C_x – концентрація афлатоксину в пробі, яка аналізується (мкг/кг);

C – концентрація афлатоксинів з урахуванням їх вмісту в робочому стандартному розчині та відношення площ піків на хроматографі аналізуємої проби та стандарту;

2 – коефіцієнт перерахунку згідно методики;

2, 1000 і ще раз 1000 – коефіцієнт перерахунку згідно методики, нанограм (нг) в мікрограми і мкг/г проби в мкг/кг проби.

Лабораторна робота 2.5. Ідентифікація та визначення вмісту афлатоксину М₁ у молоці методом високоефективної рідинної хроматографії.

Принцип методу. Афлатоксин М₁ є 4-гідроксипохідним афла-токсину В₁. Він може виявлятися в молоці корів, які споживали корм, що забруднений

афлатоксином В₁ (продукується різними видами пліснявих грибів *Aspergillus*).

Методика визначення вмісту афлатоксину М₁ у молоці методом високоефективної рідинної хроматографії з використанням флуоресцентного детектора базується на вимірі інтенсивності флюоресценції та порівнянні стандартних проб (із визначеним вмістом цього афлатоксину) з пробами, які аналізуються.

Матеріали для дослідження: натуральне молоко або розчин 5 г сухого молока в 50 см³ дистильованої води.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: високоефективний рідинний хроматограф із флуоресцентним детектором; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; центрифуга, яка забезпечує 3000–4000 об/хв; пристрій для упарювання (ротаційний випарник); апарат для струшування типу «Вортекс»; водяна баня; дистильована вода; натрію хлорид і сульфат; лимонна (цитринова) кислота; діетиловий етер; хлороформ; метанол; гексан; толуол; ацетон; оцтова кислота; ацетонітрил; силікагель; високоочищений кристалічний афлатоксин М₁; піпетки з об'ємом дозування 0,1–10 см³; мікрошприц з об'ємом дозування 20 мм³; конічна колба ємністю 50, 100, 150 см³; центрифужні склянки ємністю 25 або 50 см³; ділильна воронка; мірні циліндри ємністю 50 і 100 см³; мікрошприц або мікропіпетка ємністю 10 мм³; фільтрувальний папір (синя стрічка) та все необхідне для фільтрування; вата.

Хід роботи:

Включають рідинний хроматограф в електромережу і встановлюють параметри аналізу згідно з «Інструкцією щодо експлуатації». Дають йому вийти на режим і прогрівають 30 хв.

Проби молока відбирають відповідно до існуючих правил для визначення мікотоксинів.

У конічну колбу ємністю 250 см^3 додають 50 см^3 натурального коров'ячого молока або розчин 5 г сухого молока в 50 см^3 дистильованої води, по 10 см^3 розчину в дистильованій воді 2 г натрію хлориду і $0,24\text{ г}$ лимонної кислоти, 120 см^3 хлороформу (всі складові частини суміші попередньо підігрівають до $35\text{--}38\text{ }^\circ\text{C}$). Колбу закривають корком і ретельно струшують $2\text{--}3$ хв. Потім вміст колби переносять у центрифужні склянки і центрифугують 15 хв при $3000\text{--}4000$ об/хв. Вміст склянок переносять у ділильну воронку, відстоюють і відокремлюють нижній хлороформний шар. Його висушують над безводним натрію сульфатом, хлороформний розчин фільтрують у мірний циліндр і заміряють об'єм фільтрату, а потім упарюють до об'єму 5 см^3 .

Для очищення отриманого екстракту використовують скляну колонку, яку готують наступним чином: на дно колонки вкладають шматочок вати і поміщають до колонки шар товщиною 5 см^3 безводного натрію сульфату, на який обережно нашаровують суспензію силікагелю (2 г силікагелю в 2 см^3 гексану). Коли силікагель осяде, зверху ще раз насипають шар товщиною 5 мм безводного натрію сульфату. Потім вносять 5 см^3 екстракту, що аналізується, дають можливість розчиннику стекти. Колонку послідовно промивають 25 см^3 сумішшю толуол:оцтова кислота ($9,5:0,5$), 25 см^3 гексану і 25 см^3 сумішшю етер:гексан:ацетонітрил ($5:3:1$).

Афлатоксин M_1 вимивають із колонки 60 см^3 суміші хлороформ: ацетон ($4:1$). Елюат, що отримують, насухо упарюють на ротаційному випарнику. Залишок розчиняють в 200 мм^3 хлороформу і аналізують із використанням хроматографа, який містить флуоресцентний детектор. У хроматограф уводять, як правило, 20 мм^3 очищеного розчину екстракту з проби.

При хроматографуванні, рухомою фазою є суміш діетиловий етер:метанол:вода ($90:8:2$). Швидкість потоку рухомої фази – $1\text{ см}^3/\text{хв}$.

Рекомендується використовувати перегнаний метанол і бідистильовану воду, а діетиловий етер перед використанням пропустити через колонку з

алюмінію оксидом. Всі розчинники необхідно перед використанням профільтрувати.

При використанні флуоресцентного детектора встановлюють довжину хвилі збудження ($\lambda_{\text{збуд.}}$) 360 нм, а довжину хвилі випромінювання ($\lambda_{\text{випр.}}$) – 425 нм. Чутливість детектора налаштовують так, щоби уведення 0,6–0,8 нг афлатоксину M_1 відповідало відхиленню пера самописця на повну шкалу при рівні шуму 3–5 % від цієї шкали. За таких умов межа виявлення афлатоксину M_1 складає 0,1 нг.

Після кожного вводу екстракту проби, знімають і записують хроматограму, а також визначають висоту піку, який співпадає за часом виходу з піком стандартного афлатоксину M_1 .

Приготування стандартних розчинів афлатоксину M_1

Наважку кристалічного афлатоксину M_1 масою 1 мг поміщають у мірну колбу ємністю 100 см³ і доводять до мітки сумішшю бензол: ацетонітрил (9:1). Концентрація афлатоксину M_1 у приготовленому основному стандартному розчині становить 10 нг/мм³.

Для приготування стандартних робочих розчинів афлатоксину M_1 із концентрацією 0,2 нг/мм³; 0,4; і 0,6 нг/мм³, у мірну колбу ємністю 50 см³, 100 і 150 см³ вносять 1 см³, 2 і 3 см³ стандартного розчину, відповідно. Вміст цих колб доводять до мітки сумішшю бензол: ацетонітрил (9:1).

У хроматограф вводять, як правило, 20 мм³ робочого розчину стандарту (об'єм уведеної проби). Після кожного вводу робочого стандарту афлатоксину M_1 знімають і записують хроматограми, в яких визначають площу (висоту) піку афлатоксину M_1 . Час утримування цього афлатоксину в зазначених умовах (див. вище) складає 8–9 хв.

Стандартний розчин афлатоксину M_1 зберігають в холодильнику при температурі нижче 0 °С, термін його придатності – до 1 року.

Проведення розрахунків

Масову концентрацію афлатоксину M_1 обчислюють за формулою:

$$P_x = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot m_{см.}}{V_2 \cdot V_4 \cdot m} \cdot \frac{S_x}{S_{см.}},$$

де P_x – концентрація (масова частка) афлатоксину M_1 у молоці (мкг/кг);

V_1 – об'єм хлороформу, взятий для екстракції (см³);

V_2 – об'єм хлороформного екстракту, взятого для аналізу (см³);

V_3 – об'єм очищеного екстракту в хлороформі перед хроматографією (мм³);

V_4 – об'єм проби екстракту, що вводиться в хроматограф (мм³);

$m_{см.}$ – маса афлатоксину M_1 у введеному об'ємі стандарту (нг);

$S_{см.}$ – площа піку на хроматографі робочого стандарту афлатоксину (мм²);

S_x – площа піку афлатоксину на хроматограмі проби, яка аналізується (мм²);

m – наважка проби, яка аналізується (г).

За відсутності інтегратора у складі хроматографа площу хроматографічного піку (S , мм²) розраховують за формулою:

$$S = h \cdot a_{0,5},$$

де h – висота піку (мм);

$a_{0,5}$ – ширина, яка виміряна на половині висоти (мм).

Якщо неможливо вирахувати площу піків (вони мають малу ширину і відсутній інтегратор), то можна скористатися тільки висотою піків (мм), хоча цей прийом менш точний.

Якщо пік афлатоксину M_1 на хроматограмі проби виходить за межі повної шкали самописця, то для повторного аналізу необхідно зменшити об'єм проби екстракту (V_4), що вводиться в хроматограф, або розбавити розчин екстрактом хлороформу (збільшити об'єм V_3) і в хроматограф ввести аліквоти цього розчину.

Лабораторна робота 2.6. Ідентифікація та визначення вмісту охратоксину А у зерні методом високоефективної рідинної хроматографії.

Принцип методу. При визначенні токсичності мікроскопічного гриба *Aspergillus ochraceus* були виділені три хімічно близьких міко-токсини – охратоксини А, В і С. Крім різних видів мікроскопічних грибів *Aspergillus*, охратоксини продукуються також мікроскопічними грибами родини *Penicillium*.

Охратоксин А є похідним кумарину, він за хімічною структурою – 5-хлор-ізокумарин, який пептидним зв'язком зв'язаний з L-феніл-аланіном ($C_{20}H_{18}ClNO_6$). У природних умовах України охратоксин А найбільше забруднює зерно пшениці, ячменя, кукурудзи та вироби з їх борошна.

Методика визначення вмісту охратоксину А методом високо-ефективної рідинної хроматографії з використанням флуоресцентного детектора базується на вимірюванні та порівнянні інтенсивності флуоресценції експериментальних проб із стандартними (з визначеним вмістом цього мікотоксину) пробами.

Матеріали для дослідження: зерно.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: високоефективний рідинний хроматограф із флуоресцентним детектором; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; дрібно подрібнювальний зерно пристрій (кавомолка); апарат для струшування колб (шутель); водяна баня; пристрій для упарювання (ротатійний випарник); дистильована вода; оцтова кисло-та; хлороформ; метанол; бензол; натрію гідрокарбонат; сульфатна кислота; безводний натрію сульфат; високоочищений кристалічний охратоксин А; плоскодонні конічні та круглодонні колби ємністю 250 см³; грушоподібна колба ємністю 50 см³; мірна колба ємністю 100 см³; мірний циліндр ємністю 50 см³; ділильні лійки

ємністю 50 см³; хімічні лійки; піпетки; мікрошприц або мікропіпетка об'єм дозування 20 мм³; універсальний паперовий рН-індикатор; фільтрувальний папір (синя стрічка) та все необхідне для фільтрування.

Хід роботи:

Включають рідинний хроматограф в електромережу і встановлюють параметри аналізу згідно з «Інструкцією щодо експлуатації». Дають йому вийти на режим і прогрівають 30 хв.

Проби відбирають відповідно до існуючих правил відбору проб сільськогосподарської продукції та харчових продуктів для визначення мікотоксинів.

Наважку 25 г дрібноподрібненої проби поміщають у плоскодонну конічну колбу ємністю 250 см³ і до неї додають 12,5 см³ 1 %-го розчину в дистильованій воді оцтової кислоти та 125 см³ хлороформу. Колбу закривають корком та її вміст струшують на апараті для струшування протягом 30 хв. Одержану суміш фільтрують через паперовий складчастий фільтр у мірний циліндр, із якого відбирають 50 см³ фільтрату.

Для очищення отриманого екстракту переносять 50 см³ фільтрату і додають 35 см³ 3 %-го розчину натрію гідрокарбонату в суміші метанол:вода (2:8). Отриману суміш струшують (вручну) і після розділення шарів, верхній водний шар відкидають. У подальшому з нижнього хлороформного шару двічі (2×35 см³) реекстрагують охратоксин А 3 %-вим розчином натрію гідрокарбонату в суміші метанол:вода (2:8), як це робилося раніше.

Об'єднанні водні реекстракти поміщають у ділильну лійку з 25 см³ хлороформу і двічі проводять розділення суміші. Кожен раз після розділення водного і хлороформного шарів відкидають нижній хлороформний шар.

До водного екстракту додають 10 см³ 2 М розчину сульфатної кислоти у воді з рН 2–3 (контролюють рН за допомогою універсального паперового рН-індикатора). З цього розчину негайно екстрагують охратоксин А при

струшуванні в ділильній лійці послідовно: один раз з 50 см³ хлороформу (1×50 см³) і два рази з 25 см³ хлороформу (2×25 см³). Об'єднані хлороформні екстракти висушують протягом 30 хв при їх взаємодії з 10 г безводного натрію сульфату. Отриманий після цього розчин фільтрують через хімічну воронку з шматочком вати в круглодонну колбу ємністю 250 см³, а натрію сульфат промивають 15 см³ хлороформу і фільтрують хлороформ у ту ж колбу. Потім хлороформний розчин упарюють насухо з використанням ротаційного випарника при температурі водяної бані не вище 40–45 °С. Залишок розчиняють в 5 см³ хлороформу і фільтрують через складчастий паперовий фільтр у грушоподібну колбу ємністю 50 см³. Круглодонну колбу ополіскують 5 см³ хлороформу і отримані такі змиви фільтрують у ту ж грушоподібну колбу, а фільтрат промивають 2 см³ хлороформу. Хлороформний розчин упарюють насухо на ротаційному випарнику. Отриманий залишок розчиняють в 400 мм³ метанолу і цей розчин містить охратоксин А, який екстрагували з проби (отримуємо експериментальну пробу). Для хроматографічного аналізу одноразово використовують, як правило, 20 мм³ цього розчину.

Рухома фаза – суміш метанол:вода:сульфатна кислота (75:25:1,5), швидкість її потоку – 1 см³/хв. Рекомендується використовувати перегнаний метанол і бідистильовану воду, які попередньо фільтрують через складчастий паперовий фільтр.

Нерухома фаза – силікагель, який хімічно зв'язаний з октадецил-силаном (довжина колонки 25 см, внутрішній діаметр – 4,0 мм).

При використанні флуоресцентного детектора встановлюють довжину хвилі збудження ($\lambda_{збуд.}$) 330 нм, а довжину хвилі випромінювання ($\lambda_{випр.}$) – 420 нм.

Чутливість детектора встановлюють так, щоби відхилення пера на повну шкалу самописця відповідало вводу в хроматограф 5 нг охратоксину А при рівні шуму 3–5 % від повної шкали. За зазначених умов межа виявлення

охратоксину А становить 0,5–1,0 нг. Час виходу піку охратоксину А складає 6,5–8,5 хв у залежності від випадкових змін в умовах експерименту.

Для кожної кількості введеного в хроматограф робочого стандартного розчину охратоксину А (1, 2, 3 і 5 нг) і проби визначають час утримування піків на хроматографі для ідентифікації охратоксину А в пробі, а також висоту піків для кількісного визначення мікотоксину в ній.

Приготування стандартних розчинів охратоксину А

Наважку високоочищеного кристалічного охратоксину А масою 5 мг розчиняють у мірній колбі ємністю 100 см³ у суміші бензол:сульфатна кислота (99:1) і доводять об'єм колби до мітки. В отриманому основному стандартному розчині концентрація охратоксину А становить 50 нг/мм³.

Робочий стандартний розчин охратоксину А готують наступним чином: до 0,1 см³ основного стандартного розчину додають 5 см³ метанолу. Концентрація охратоксину А в робочому стандартному розчині – 1 нг/мм³. Стандартний розчин зберігають в холодильнику за температури нижче 0 °С. Термін придатності – до 1,5 роки.

Проведення розрахунків

Обчислювання концентрації охратоксину А проводять за формулою:

$$P_x = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot m_{ст.}}{V_2 \cdot V_4 \cdot m} \cdot \frac{S_x}{S_{ст.}},$$

де P_x – концентрація (масова частка) охратоксину А в молоці (мкг/кг);

V_1 – об'єм хлороформу, взятий для екстракції (см³);

V_2 – об'єм хлороформного фільтрату, взятого для аналізу (см³);

V_3 – об'єм досліджуваного розчину (мм³);

V_4 – об'єм досліджуваного розчину, який введено в хроматограф (мм³);

$m_{ст.}$ – маса стандарту охратоксину А, який введено в хроматограф (нг);

$S_{ст.}$ – площа піку на хроматографі робочого стандарту охратоксину А (мм²);

S_x – площа піку на хроматограмі проби, яка аналізується (мм²);

m – наважка проби для аналізу(г).

За відсутності інтегратора у складі хроматографа площу хроматографічного піку (S , мм²) розраховують за формулою:

$$S = h \cdot a_{0,5},$$

де h – висота піку (мм);

$a_{0,5}$ – ширина, яка виміряна на половині висоти (мм).

Якщо неможливо вираховувати площу піків (пікі мають малу ширину і відсутній інтегратор, то можна скористатися тільки висотою піків, мм), хоча цей прийом менш точний.

Якщо пік охратокисну А на хроматограмі проби, що аналізується, виходить за межі повної шкали самописця, то для повторного аналізу необхідно зменшити об'єм досліджуваного розчину (V_4), що вводиться в хроматограф, або розбавити цей розчин (V_3) хлороформом і ввести аліквоти цього розчину.

Лабораторна робота 2.7. Ідентифікація та визначення вмісту мікотоксину патуліну в харчових продуктах методом високоефективної рідинної хроматографії.

Принцип методу. Патулін – мікотоксин, який продукується пліснявими грибами, зокрема *Penicillium expansum* (збудник гнилизни у фруктах і томатах); *Penicillium urticae* (у фруктах і фруктових виробках); *Byssochlamis nivea* (у фруктових соках, напоях та ін.).

Методика визначення вмісту патуліну методом високоефективної рідинної хроматографії з використанням ультрафіолетового (УФ) детектора базується на екстракції цього мікотоксину з продукту, що аналізується, органічним розчинником, очищення екстракту і подальшої ідентифікації та вимірювання вмісту патуліну.

Матеріал для дослідження: фруктовий сік (яблучний, грушевий, абрикосовий, персиковий, томатний та ін.) або фруктові напої, пюре, повидло, джем, варення, фруктовий порошок.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: високоефективний рідинний хроматограф із УФ-детектором; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; водяна баня; пристрій для упарювання (ротаційний випарник); апарат для струшування типу «Вортекс»; дистильована вода; силікагель; натрію хлорид і сульфат; бензол; гексан; етиловий спирт; етилацетат; ацетонітрил; ізопропанол; калію гексаціаноферрат і цинку ацетат 2-х водні; калію перманганат; бензидин; октадецилсилан; високоочищений кристалічний патулін; плоскодонні, гостродонні, грушоподібні та мірні колби ємністю 100 і 250 см³; ділильні лійки ємністю 250 см³; хімічні склянки ємністю 100 см³; піпетки об'ємом 1,0–10,0 см³; мікрошприц або мікропіпетка об'ємом 10 мм³; мірний циліндр ємністю 250 см³; фільтрувальний папір (синя стрічка) та все необхідне для фільтрування.

Хід роботи:

Включають рідинний хроматограф в електромережу і встановлюють параметри аналізу згідно з «Інструкцією щодо експлуатації». Дають йому вийти на режим і прогрівають 30 хв.

Проби відбирають відповідно до існуючих правил відбору проб сільськогосподарської продукції та харчових продуктів для ідентифікації та визначення вмісту мікотоксинів.

Наважку 50 г соків, напоїв, пюре або 25 г повидла, джему, варення, фруктового порошку поміщають у хімічну склянку і змішують з 10 см³ дистильованої води. Отриману суміш переносять у мірну колбу ємністю 250 см³, до якої додають по 15 см³ калію гексаціаноферрату 2-х водного (150 г/дм³ води) і цинку оцтовокислого 2-х водного (200 г/дм³ води). Це так звані розчини Карреза 1 і Карраза 2, відповідно. Вміст колб дистильованою

водою доводять до мітки і фільтрують у мірний циліндр крізь паперовий складчастий фільтр.

У подальшому проводять екстракцію патуліну з підготовленої проби для аналізу. Для цього 50 см³ отриманого фільтрату переносять у ділильну лійку і туди ж вносять 50 см³ етилацетату, інтенсивно струшують приблизно 1 хв. Після відстоювання суміші, водний нижній шар зливають назад у циліндр, а етилацетатний екстракт переносять у круглодонну колбу. З водної фази проводять екстрагування залишків патуліну свіжою порцією етилацетату аналогічним способом. При цьому після перемішування протягом 1 хв у ділильну лійку вносять 10 г натрію хлористого і продовжують перемішувати ще 30 с. Після відстоювання і розділення шарів водну фазу відкидають, а етилацетатні екстракти об'єднують і висушують у плоскодонній колбі шляхом додавання 20 г натрію сульфату. Після цього отриманий екстракт фільтрують у відгінну грушоподібну колбу ротаційного випарника. Натрію сільфат, який залишився, ополіскують 10 см³ етилацетату і фільтрують у відгінну колбу. Отриманий екстракт упарюють на ротаційному випарнику насухо при температурі 35–40 °С, а залишок розчиняють у 1 см³ етилацетату. Це і буде екстракт, який в подальшому очищують. Таким чином, наступний етап – це очищення екстракту патуліну від супутніх речовин (білків, вуглеводів, жирів, пігментів) на хроматографічній колонці (довжина 30 см, діаметр 5 мм). На дно скляної колонки поміщають ватний тампон, поверх якого насипають натрію сульфат товщиною 5 мм, а потім вносять суспензію 2 г силікагелю в 15 см³ бензолу. На вологий ще шар силікагелю насипають шар натрію сульфату товщиною 10 мм. Після того, як бензол стече, на верхній шар натрію сульфату наносять екстракт, якому дають повністю вбратися у фільтрувальний шар. Перегінну колбу ополіскують 0,5 см³ етилацетату і отриманий змив теж вносять у колонку і дають йому повністю увібратися у фільтрувальний шар.

У подальшому в колонку вносять 25 см³ бензолу і дають йому повністю пройти через фільтрувальний шар, а бензольний елюат відкидають. Потім у колонку додають 100 см³ суміші бензол:етилацетат (3:1), збирають елюат і його переносять у відгінну колбу, упарюють на ротаційному випарнику при температурі 35–40 °С насухо. Залишок розчиняють в 0,2 см³ етилового спирту для аналізу методом високоефективної рідинної хроматографії. Використовують УФ-детектор, довжина хвилі – 275 нм. Нижня межа визначення патуліну – $5 \cdot 10^{-7}$ %.

Рухома фаза – суміш гексан:ізопропанол (4:1), швидкість її потоку – 1,0 см³/хв. Нерухома фаза – силікагель, який хімічно зв'язаний з октадецилсиланом (довжина колонки 25 см, внутрішній діаметр – 4,0 мм).

Результати (хроматограма), які отримані для проби, що аналізується, порівнюють із такими для робочих стандартних розчинів. За часом отримання піків на хроматографі ідентифікується патулін, а висотою піку – кількісне визначення цього мікотоксину в аналізуемій пробі.

Приготування стандартних розчинів патуліну

Наважку масою 5 мг високоочищеного кристалічного патуліну в хімічній склянці розчиняють у 10 см³ суміші бензол:ацетонітрил (9:1). Після перемішування, вміст стаканчика акуратно переносять у мірну колбу ємністю 100 см³, склянку ополіскують ще двома порціями по 10 см³ того ж розчинника та їх переносять у ту ж мірну колбу. Об'єм у колбі доводять до мітки при ретельному перемішуванні. Одержаний розчин в об'ємі 20 см³ переносять в іншу мірну колбу ємністю 100 см³ і доводять об'єм у колбі до мітки. Термін придатності основного стандартного розчину при температурі нижче 0 °С – 6 місяців.

Точну концентрацію патуліну в основному стандартному розчині визначають спектрофотометричним методом наступним чином: 6 см³ основного стандартного розчину упарюють на ротаційному випарнику насухо при температурі 35–40 °С. Залишок розчиняють у 9 см³ етилового

спирту і визначають оптичну густину при довжині хвилі 275 нм у кварцовій кюветі з довжиною поглинаючого шару 1 см у відношенні до етилового спирту.

Масову концентрацію патуліну в основному стандартному розчині обчислюють за формулою:

$$C_{ст.} = \frac{M \cdot k \cdot E}{\varepsilon \cdot l} \cdot 10^3 ,$$

де $C_{ст.}$ – концентрація (масова частка) патуліну в основному стандартному розчині;

M – молярна маса патуліну, $M = 154$ г/моль;

k – коефіцієнт розведення, $k = 1,5$;

E – екстинкція (оптична густина) розчину патуліну, який аналізується;

10^3 – коефіцієнт перерахунку згідно методики;

ε – молярний коефіцієнт поглинання стандартного розчину патуліну при $\lambda = 275$ нм,
 $\varepsilon = 1,46 \cdot 10^4$ дм³/моль·см;

l – довжина поглинального шару стандартного розчину патуліну (см).

При приготуванні робочого стандартного розчину патуліну, 1 см³ основного стандартного розчину вносять у відгінну колбу та упарюють насухо на ротаційному випарнику при температурі 35–40 °С. Залишок розчиняють в 5 см³ етилового спирту і зберігають у закритій віалі. Для дослідження використовують 10 мм³ робочого стандартного розчину. При використанні отриманої хроматограми, встановлюють час утримання та висоту піку патуліну.

Градуювальний коефіцієнт робочого стандартного розчину обчислюють за формулою:

$$K = \frac{m \cdot V}{S} ,$$

де K – градувальний коефіцієнт (мкг/мм);

$m_{ст.}$ – масова концентрація патуліну в робочому стандартному розчині (мкг/мм³);

V – об'єм робочого стандартного розчину патуліну (мм³);

S – площа піку патуліну (мм²).

Проведення розрахунків:

При проведенні досліджень проби, в хроматограф вводиться 10 мм³ очищеного екстракту. За наявності піку на хроматограмі аналізованої проби, який співпадає за часом утримання з піком у робочому стандартному розчині робиться висновок про наявність цього мікотоксину в пробі продукту, що досліджується. Для визначення вмісту патуліну в пробі, яка аналізується, розрахунок масової частки у %, що є загальноприйнятим, обчислюють за формулою:

$$P_x = \frac{S_x \cdot K \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot V_4 \cdot m} \cdot 10^{-4},$$

де P_x – масова частка патуліну у відсотках в пробі, що аналізується (%);

S_x – площа піку патуліну проби, яка аналізується (мм²);

K – градувальний коефіцієнт (мкг/мл);

V_1 – загальний об'єм, в якому розведена наважка (см³);

V_2 – об'єм фільтрату, взятий для аналізу (см³);

V_3 – об'єм, до якого сконцентровано екстракт після доочищення (см³);

V_4 – об'єм екстракту, введений в хроматограф (см³);

m – маса наважки продукту, взятого для аналізу (г);

10^{-4} – коефіцієнт перерахування згідно методики.

При необхідності визначення масової концентрації патуліну в пробі, яка аналізується, необхідно провести відповідні перерахунки.

За відсутності інтегратора у складі хроматографа площу хроматографічного піку (S , мм²) розраховують за формулою:

$$S = h \cdot a_{0,5},$$

де h – висота піку (мм);

$a_{0,5}$ – ширина, яка виміряна на половині висоти (мм).

Якщо неможливо вирахувати площу піків (мають малу ширину і відсутній інтегратор), то можна скористатися тільки висотою піків, (мм), хоча цей прийом менш точний.

Якщо пік патуліну на хроматограмі проби, що аналізується, виходить за межі повної шкали самописця, то для повторного аналізу необхідно зменшити об'єм цієї проби (V_4), що вводиться в хроматограф, або розбавити цей розчин (V_3) етиловим спиртом і в хроматограф ввести аліквоти цього розчину.

Лабораторна робота 2.8. Визначення вмісту афлатоксину B_1 та суми афлатоксинів B_1 , B_2 , G_1 та G_2 у зерні, фруктах та продуктах з них методом високоефективної рідинної хроматографії.

Принцип методу. Афлатоксини екстрагують за допомоги суміші метанол: вода (70:30). Екстракт після фільтрування і за необхідності розбавлення водою вносять до імунологічної колонки, що містить специфічні до афлатоксинів B_1 , B_2 , G_1 та G_2 антитіла. Афлатоксини ізолюють, очищують і концентрують на колонці, а потім видаляють з комплексу їх з антитілом за допомогою метанолу. Кількісно афлатоксини визначають високоефективною рідинною хроматографією оберненої фази з флуоресцентним детектуванням. За необхідності результат перевіряють постколонковою дериватизацією йоду в розчині метанолу.

Матеріали для дослідження: зерно і фрукти з твердою шкіркою, продукти з них.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: хроматограф для проведення ВЕРХ з насосом для рідинної хроматографії, який здатний створювати швидкість подавання елюенту $1 \text{ см}^3/\text{хв.}$, системою введення зразка (інжектором) з клапаном введення, що заряджається шприцем з петлею на 50 мм^3 або іншою подібною петлею, аналітичною

колонкою оберненої фази, що забезпечує базове відокремлення піків афлатоксинів B_1 , B_2 , G_1 та G_2 , довжиною 250 мм і внутрішнім діаметром 4,6 мм, системою для постколонкової дериватизації йоду (корпус з нержавіючої сталі або політетрафторетилену розмірами: 30–50 см, внутрішній діаметр 0,5 мм), флуоресцентним детектором збудження на довжині хвилі 435 нм (межа детектування не менше 0,05 нг афлатоксину B_1 на об'єм 50 мм^3 введеного зразка), системою обробки даних з відповідним програмним забезпеченням; імуноафінна колонка (містить антитіла афлатоксинів B_1 , B_2 , G_1 та G_2 , мінімальна зв'язувальна здатність 100 нг афлатоксину B_1 та повернення не менше 80 % для афлатоксинів B_1 , B_2 , G_1 , а також 60% для афлатоксину G_2 , має резервуар для розчинника, наприклад, шприц з адаптором); вакуумний колектор для приєднання імуноафінної колонки; спектрофотометр, який здатний вимірювати за довжини хвиль від 200 нм до 400 нм, з кварцовими кюветами довжиною оптичного шляху 1 см; нагрівальна водяна баня, змішувач місткістю на 500 см^3 та накривкою; терези аналітичні 2-го класу точності; апарат для струшування типу “Вортекс”; механічний вібраційний гомогенізатор; азотний випарник з температурою бані 50°C ; ацетонітрил, метанол, толуол, натрій хлористий (кристалічний), йод (кристалічний), сульфатна (сірчана) кислота; рухома фаза (дистильована вода : ацетронітрил у співвідношенні 98:2); розчинник для екстрагування (метанол:дистильована вода у співвідношенні 70:30); афлатоксини в кристалічній формі (для приготування тест-стандартів); мірні пробірки із притертим скляним корком місткістю 2 см^3 , конічні колби з притертим скляним корком місткістю 50 см^3 , градуйовані піпетки або дозатори місткістю $0,5\text{--}1,5 \text{ см}^3$, мікрошприц місткістю 500 мм^3 , штатив для пробірок, гофрований фільтрувальний папір діаметром 24 см, армований склом фільтрувальний папір діаметром 11 см.

Хід роботи:

Перед початком досліджень готують ряд розчинів:

1. **Підготовка лабораторного посуду.** У 2 моль/см³ сульфатній (сірчаній) кислоті замочують на кілька годин лабораторний посуд, що можливо контактував з розчинами афлатоксинів, ретельно промивають спочатку водопровідною, а потім дистильованою водою для видалення слідів кислоти. Відсутність кислоти перевіряють у змивах посуду індикатором рН.

2. **Приготування основних розчинів афлатоксинів.** Розчиняють окремо афлатоксини В₁, В₂, G₁ та G₂ в розчині тулуол : ацетронітрил (98:2) для отримання окремих розчинів, які містять 10 мкг афлатоксину / см³. Для визначення точної концентрації конкретного афлатоксину в кожному основному розчині будують криву адсорбції в діапазоні довжин хвиль від 330 нм до 370 нм в кюветах з кварцового скла з довжиною оптичного шляху 1 см за використання спектрофотометра.

3. Розраховують масову концентрацію кожного афлатоксина (P_i) в одиницях мкг/ см³ за використання формули:

$$P_i = \frac{A_{max} \times M_i \times 100}{\varepsilon_i \times d}$$

де A_{max} – значення показника (міра) поглинання світла , яка визначена для максимуму кривої адсорбції ;

M_i – відносна молекулярна маса кожного афлатоксину г/моль;

ε_i – молярна поглинальна здатність кожного афлатоксину в суміші тулуол : ацетронітрил (98:2), м²/ моль ;

d – довжина оптичного шляху кювети , см.

Значення M_i та ε_i і наведені в Таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Відносна молекулярна маса (M_i) та молекулярна адсорбційна здатність (ε_i) афлатоксинів В₁, В₂, G₁ та G₂ (в суміші толуол : ацетронітрил у співвідношенні 98:2).

Афлатоксин	Мі , г/моль	ϵ_i , м ² / моль
В ₁	312	1930
В ₂	314	2040
G ₁	328	1660
G ₂	330	1790

3. Основний розчин змішаних афлатоксинів. Основний розчин афлатоксинів готують наступним чином: в суміші толуол: ацетронітрил (98:2) готують розчин, що містять 500 нг/см³ афлотоксину В₁, 125 нг/см³ афлотоксини В₂ , 250 нг/см³ афлатоксину G₁ та 125 нг/дм³ афлатоксину G₂ . Пробірку, в яку поміщують суміш приготовлених розчинів афлатоксинів обмотують фольгою та зберігають за температури приблизно 4 °С.

4. Тест-стандартні розчини змішаних афлатоксинів. В 4 пробірки додають по 1 см³ метанолу та вказаний в таблиці 2 об'єм основного розчину змішаних афлатоксинів, щоби після ретельного перемішування і доведення в пробірках об'єму метанолом до позначки 2 см³, в кожній пробірці концентрація афлатоксинів була така, як вказано в Таблиці 2.2. Ці розчини необхідно використовувати в день приготування.

5. Розчинник для екстрагування афлатоксинів зі зразків. Розчинник готують змішуванням метанолу з дистильованою водою у співвідношенні 70:30.

6. Приготування розчину для постколонкової дериватизації. Розчиняють 100 мг кристалічного йоду у 2 см³ метанолу, додають 200 см³ дистильованої води, збовтують протягом 1 год та фільтрують через мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Таблиця 2.2 – Приготування тест-стандартних розчинів афлатоксинів

Номер пробірки з тест-стандартним розчином афлатоксинів	Взятий об'єм основного розчину змішаних афлатоксинів, мм ³	Масова концентрація афлатоксинів, нг/см ³			
		V ₁	V ₂	G ₁	G ₂
1	60	15,00	3,75	7,50	3,75
2	40	10,00	2,50	5,00	2,50
3	20	5,00	1,25	2,50	1,25
4	10	2,50	0,625	1,25	0,625

7. Екстрагування афлатоксинів. Зважують (з точністю до 10 мг) 25 г гомогенізованого зразка у вмістилищі змішування, додають 5 г натрію хлористого і 125 см³ розчинника екстрагування та додатково ще гомогенізують розчин за допомогою змішувача протягом 2 хв. на великій швидкості.

Отриманий розчин фільтрують за допомогою гофрованого паперу. Наливають 15 см³ (V₂) фільтрату (об'єм V₁) у конічну колбу місткістю 25 см³ зі скляним корком. Додають 30 см³ дистильованої води, закривають колбу корком і переміщують. Перед початком афінної хроматографії розбавлений екстракт фільтрують через армований склом фільтрувальний папір. Фільтрат (об'єм V₃) повинен бути світлим. В іншому випадку повторюють фільтрування.

8. Очищення екстракту афлатоксинів. Імуноафінну колонку готують до роботи згідно “Інструкції виробника”. Відбирають 15 см³ (V₄) другого фільтрату (V₃) в резервуар для розчинника імуноафінної колонки. Збирають елюент метанолу або ацетронітрилу (залежно від зразка та “Інструкції виробника”) в мірній пробірці місткість 2 см³. Доводять дистильованою водою (об'єм V₅) до позначки 2 см³. Перемішують і приступають до проведення хроматографування.

Випробувальні та тест-стандартні розчини для визначення афлатоксинів повинні містити в собі один і той самий розчинник або розчинну суміш.

9. Основні робочі умови проведення ВЕРХ. Готують хроматограф до роботи згідно “Інструкції по експлуатації”. Оптимальними характеристиками функціонування аналітичної колонки оберненої фази для забезпечення відокремлення піків на хроматограмі досліджуваних афлатоксинів є :

- витрати рухомої фази – $1 \text{ см}^3/\text{хв}$;
- витрати розчину для постколонкової дериватизації – $0,3 \text{ см}^3/\text{хв}$;
- об'єм зразка 50 мм^3 ;
- чутливість флуоресцентного детектора повинна бути такою, щоб відношення сигнал : шум був не менше 5:1 для $0,125 \text{ нг}$ афлотоксину G_2 в 50 мм^3 розчину. Для стабілізації дають системі попрацювати в “холостому” режимі 10-20 хв.

10. Ідентифікація піків афлатоксинів на хроматограмі. Кожний пік афлатоксину на хроматограмі зразка ідентифікують за допомогою порівняння часу утримання з часом утримання відповідних тест-стандартів. Досліджувані афлатоксини також можна ідентифікувати за допомогою одночасного введення в хроматографічну колонку випробуваного та тест-стандартного розчинів. Крім того, для ідентифікації афлатоксинів може слугувати зникнення піків афлатоксинів B_1 та G_1 у випадку відсутності розчину для постколонкової дериватизації.

11. Побудова колібрувального графіка. Калібрувальний графік будують за кожного досліджуваного афлатоксину за допомогою введення 50 мм^3 тест-стандартних розчинів номер 1, 2, 3 і 4 (див. таблицю 2.2).

12. Визначення досліджуваних афлатоксинів. Кількісне визначення афлатоксинів в екстрактах зразків проводять методом зовнішнього тест-стандарту з інтегруванням площі піка (за неможливості внаслідок вузькості піка – вимірюванням його висоти), яка співвідноситься з відповідним значенням для тест-стандарту .

У хроматографічну колонку вводять 50 мм³ тест-стандартного розчину змішаних афлатоксинів. Вони «вимивають» афлатоксини в такому порядку: G₂, G₁, B₂, B₁, з відповідним часом утримання приблизно 6,8,9 та 11 хв.

Для дослідження афлатоксинів у екстракті зразка в хроматографічну колонку вводять 50 мм³ (V₆) очищеного екстракту.

Проведення розрахунків:

Масу зразка (m_i , г ; i – номер зразка), що міститься у взятій для аналізу частині другого фільтрату (V₄) вираховують з використанням формули:

$$m_t = m_0 \frac{V_2 \times V_4}{V \times V_3};$$

де m_0 - маса зразка ($m_0 = 25$ г) ;

V – загальний об'єм першого фільтрату ($V = 125$ см³)

V_2 – об'єм частки першого фільтрату, який взятий для аналізу ($V_2 = 15$ см³) ;

V_3 – загальний об'єм другого фільтрату ($V_3 = 45$ см³) ;

V_4 – об'єм частки другого фільтрату, який взятий для аналізу ($V_4 = 15$ см³).

Масову частку кожного афлатоксину (W_i , мкг/кг маси зразка; i – номер афлатоксину) вираховують за використання формули :

$$W_i = \frac{V_5 \times m_i}{V_6 \times m_t};$$

де V_5 – об'єм елюенту ($V_5 = 2000$ мм³);

V_6 - об'єм зразка елюенту, який взятий для аналізу ($V_6 = 50$ мм³) ;

m_i – маса кожного афлатоксину (i), що визначена по виміру площі або висоти піку при співставленні з такими тест-стандартами;

m_t – маса зразка, що міститься у частці другого фільтрату, який взятий для хроматографічної колонки (V₄).

Для визначення маси суми досліджуваних афлатоксинів необхідно додати один до одного маси кожного з афлатоксинів.

Лабораторна робота 2.9. Визначення вмісту мікотоксину зеараленону в кормах.

Принцип методу. Гомогенізовані зразки корму для тварин екстрагують ацетронітрилом і освітлюють фільтруванням. Потім аліквоту фільтрату розбавляють дистильованою водою або фосфат-буферною сіллю (PBS) та очищають за допомоги імуноафінної колонкової хроматографії. Очищені екстракти аналізують методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на колонці оберненої фази з флуоресцентним детектуванням .

Матеріали для дослідження: корма для тварин (зерно пшениці та кукурудзи, овес, сухий силос та ін.).

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: хроматограф для проведення ВЕРХ з насосом що здатний створювати швидкість потоку в діапазоні від 0,1 до 1,5 см³/хв, системою введення зразка (інжектор з петлею для введення 100 мм³ розчину), аналітичною колонкою (наприклад, lichrospher 100 -RP-18 , Waters Nova – Pak C18 , ACE3C18, inertsil ODS-3, Nupersil ODS BDS), яка забезпечує базову дозволу роздільну на хроматограмі здатність піку зеаралену, довжиною 150–250 мм і внутрішнім діаметром 4 мм, флуоресцентним детектором, що придатний для вимірювань за довжин хвиль збудження 236 нм і 274 нм та емісією на довжині хвилі 440 нм (детектор мінливої довжини хвилі) або 418 нм (детектор з емісійним фільтром), системою обробки даних з відповідним програмним забезпеченням; імуноафінна колонка (наприклад, Zearela Test), яка містить антитіла зеараленону, з резервуаром для розчинника (пропіленовий , місткістю 20 см³ та внутрішнім діаметром 20 мм); спектрофотометр, який дозволяє проводити вимірювання на довжині хвилі від 200 до 400 нм і має ширину смуги не більше ± 2 нм , з кварцовими кюветами довжиною оптичного шляху 1 см; вакуумний колектор для приєднання імуноафінної колонки, апарат для струшування, терези аналітичні 2-го класу точності,

система фільтрування для розчинників (устаткування зі скла для фільтрів діаметром, наприклад, 47 мм), випарник азоту з банею, що підтримує температуру 50 °С, млин для лабораторного застосування, що дає можливість отримання часточки розміром до 1 мм; зеараленон у кристалічній формі, ацетронітрил (концентрований та розведений дистильованою водою у два рази, 50 %), метанол (концентрований та розведений дистильованою водою до 30 %, 75 см³ концентрованого метанолу змішують зі 175 см³ дистильованої води), натрію та калію хлориди (кристалічні), натрію гідроксид кристалічний та 0,2 моль / дм³ (розчиняють 8 г безводного натрію гідроксиду в 1 дм³ дистильованої води), динатрійгідрогенфосфат (кристалічний), калію дигідрогенфосфат (кристалічний), фосфат-буферна сіль (PBS, розчиняють 8 г натрій хлориду, 1,16 г динатрійгідрогенфосфату, 0,2 г калію дигідрогенфосфату та 0,2 г калію хлориду в 1 дм³; доводять рН до 7,4 за допомогою натрію гідроксиду), рухома фаза: змішати в колбі місткістю 1 дм³ 460 см³ ацетонітрилу (концентрованого) з 460 см³ дистильованої води та 80 см³ метанолу (концентрованого); ретельно суміш перемішати та відфільтрувати крізь мембранний фільтр з розмірами пор 0,45 мкм, дистильована вода; вимірювальні циліндри місткістю 25 і 50 см³, конічні колби місткістю від 125-500 см³, скляні пробірки місткістю см³, центрифужні пробірки з поліпропілену або аналогічні місткістю 50 см³, скляні лійки з внутрішнім діаметром 60 і 90 мм, шприци місткістю 100 мм³ і 5 см³, піпетки або дозатори з регульованою місткістю від 0,5 до 10 см³ штатив для пробірок, фільтрувальний папір діаметром 185 мм наприклад Ватман №. 41), фільтри мембранні полівінілдіфлуоридні (PVDF) з розміром пор 0,45 мкм і діаметром 13 мм, скляний мікроволокнистий фільтрувальний папір діаметром 125 мм (наприклад, Ватман № 934 АН), сітчасті фільтри з розмірами пор не більше 1 мм.

Хід роботи:

Перед початком досліджень готуються ряд розчинів.

1. **Приготування тест-стандартного зеараленону.** Зважують 5,0 мг зеараленону (з точністю до 0,1 мг), поміщають у мірну колбу місткістю (100 см³) цим же розчинником.

2. **Калібрування тест-стандартного розчину зеараленону.** Переносять 4 см³ тест-стандартного розчину зеараленону в мірну колбу місткістю 25 см³ і доводять до позначки (25 см³) концентрованим ацетонітрілом (приблизна концентрація зеараленону 8 мкг (см³ ацетронітрілу).

Вимірюють адсорбцію отриманого розчину в ультрафіолетовій області світла спектрофотометра в максимумі кривої поглинання за використання спектрофотометра і кварцевої кювети з довжиною оптичного шляху 1 см.

Розраховують масову концентрацію зеараленону (P , мг/см³) за використання формули :

$$P = \frac{M \cdot 1000 \cdot A \cdot 25}{4 \cdot E},$$

де M – відносна молекулярна маса (для зеараленону – 318,4);

A – значення показника ультрафіолетової адсорбції;

E – емісія, яка за довжини хвилі 274 нм становить 12623.

Результат розрахунку масової концентрації зеараленону визначають до третьої значущої цифри.

Готовий тест – стандартний розчин зеараленону стійкий протягом року при зберіганні у холодильнику при 4 °С у щільно закупореному посуді.

3. **Приготування калібрувальних тест-стандартних розчинів.** Готують п'ять тест-стандартних розчинів зеараленону з концентраціями, які зазначені в Таблиці 2.3, розведенням готового калібрувального тест-стандартного розчину.

Розчини зеараленону стійкі протягом 6 місяців при зберіганні у холодильнику при 4 °С у щільно закупореному посуді.

Таблиця 2.3 – Приготування тест-стандартних розчинів зеараленону

Номер тест-стандартного розчину зеараленону	Об'єм концентрованого ацетонітрила для розведення, (см ³)	Кінцевий об'єм тест-стандарту, (см ³)	Концентрація зеараленону, (мкг/см ³)
1	2,0	50	0,200
2	1,5	50	0,150
3	1,0	50	0,100
4	1,0	100	0,050
5	5,0	50	0,020

4. **Приготування досліджуваних зразків.** Однорідний зразок масою 50 г розмелюють так, щоб отриманий порошок повністю проходив крізь сито з номінальним розміром отворів 1мм. Потрібно використовувати обладнання для розмелювання зразків таке, що уникає перегрівання зразків.

5. **Екстрагування зеараленону із зразків та очищення отриманого екстракту.** Розмелений зразок масою 50 г вносять у конічну колбу місткістю 500 см³, додають 5 г натрію хлориду та 150 см³ екстрагуювального розчинника (змішують 900 см³ ацетонітрилу зі 100 см³ дистильованої води). Після струшування 1 год проводять очищення отриманого екстракту за допомогою імуноафінної колонки згідно інструкції застосування конкретної колонки.

За використання імуноферментної колонки Zearaba Test (стандартний розмір із широким отвором (WB)) для очищення зеараленону проводять наступні операції :

1) фільтрують 12-15 см³ екстракту зразка, що містить зеараленон, через гофрований паперовий фільтр у конічну колбу місткістю 125 см³;

2) піпеткою чи дозатором вносять 10 см³ відфільтрованого екстракту в мірну колбу місткістю 50 см³ і доводять до мітки (50 см³) дистильованою водою. Після ретельного перемішування отриманий розчин фільтрують (приблизно 50 см³) крізь скляний мікрволокнистий фільтр і вносять в центрифужну пробірку місткістю 50 см³;

3) приєднують імуноферментну колонку до отвору вакуумного колектору, а також резервуар для розчинника до верху колонки і встановлюють скляний мікрволокнистий фільтр.

4) піпеткою чи дозатором вносять 10см^3 відфільтрованого екстракту з центрифужної пробірки в приєднаний до колонки резервуар для розчинника. Пропускають екстракт через колонку за рівномірного потоку повітря доки повітря не вийде з колонки. Інтенсивність потоку екстракту через колонку повинна бути такою, щоб на виході колонки формувалися 1-2 краплі за секунду;

5) зеараленон елюють з колонки при пропусканні через неї 2см^3 метанола потоком інтенсивністю приблизно 1 крапля за секунду збираючи елюат в пробірку місткістю 5см^3 ;

6) отриманий елюат випарюють до сухого стану, використовуючи азотний випарник з температурою бані 50°C , додають 2см^3 рухомої фази (див. вище) і ретельно змішують. Цей розчин використовують для дослідження методом ВЕРХ.

6. Основні робочі умови проведення ВЕРХ. Оптимальними характеристиками функціонування аналітичної колонки оберненої фази для визначення зеараленону є:

- 1) витрати рухомої фази (швидкість потоку) – $1,0\text{ см}^3/\text{хв}$;
- 2) введений об'єм зразка і тест стандарту – 100 мм^3 ;
- 3) виявлення флуоресценції – довжина хвилі збудження 274 нм , а емісії – 440 нм для детектора зі змінною довжиною хвилі.

7. Ідентифікація зеараленону. Пік на хроматограмі зеараленону ідентифікують за допомогою порівняння часу утримування з часом утримування тест-стандарту цього мікотоксину.

8. Побудова калібрувального графіка. За використання калібрувальних розчинів тест-стандартів будують калібрувальний графік. На графік наносять значення величини флуоресценції (її сигналу)

калібрувальних розчинів тест-стандартів різних концентрацій (див. пункт 3) як функцію масових концентрацій, виражену в нанограмах.

9. Визначення зеараленону. Кількісне визначення зеараленону в екстрактах зразків проводять методом зовнішнього тест-стандарту з інтегруванням площі піку на хроматограмі (за неможливості внаслідок вузькості піка – вимірюванням його висоти), яка співвідноситься зі значенням для тест – стандарту за використання калібрувального графіку.

Проведення розрахунків:

Масову частку зеараленону (W_z – мг/кг маси зразка) вираховують за формулою:

$$W_z = \frac{St}{Sst} \times \frac{Pt}{Pst} \times \frac{150}{M} \times \frac{50}{10} \times \frac{2}{V} \times Fd,$$

де, St – площа піка на хроматограмі зеараленону в досліджуваному розчині, мм²;

Sst – площа піка на хроматограмі зеараленону в тест-стандартному розчині, мм²;

Pt – концентрація зеараленону в дослідному розчині, яка вирахована з калібрувального графіка, мкг/см³;

Pst – концентрація зеаралену в тест – стандартному розчині, мкг/см³;

M – маса наважки, г;

V – об'єм фільтрату екстракту, який взятий для дослідження (у даному випадку 10 см³);

Fd – фактор розведення (в даному випадку дорівнює 1, крім випадків, коли кінцевий об'єм зразка відрізняється від 2 см³);

150, 50 і 10 – коефіцієнти перерахунку.

Лабораторна робота 2.10. Ідентифікація та визначення вмісту залишків піретроїдів у харчових продуктах методом газорідинної хроматографії.

Принцип методу. Синтетичні піретроїди найбільш розповсюджені пестициди. До них, насамперед, відносяться: 1) амбуш (перметрин,

3-феноксibenзил-ціотранс-2,2-диметил-3-(2,2-дихлорвініл)-циклопропанкарбоксилат) – світла масляниста рідина, яка рекомендована для боротьби зі шкідниками плодових і овочевих культур, бавовника, виноградної лози та ін.; 2) децис (декаметрин, ціано-3-феноксibenзил-(2,2-дибровініл)-2,3-диметил-циклопропанкарбоксилат) – біла кристалічна речовина для боротьби зі шкідниками на яблуні, абрикосі, вишні, груші, зернових культурах, картоплі та ін.; 3) ринкорд (циперметрин, α -ціано-феноксibenзил-3-(2,2-дихлорвініл)-циклопропанкарбоксилат) – безбарвна рідина для боротьби зі шкідниками плодових і овочевих культур, виноградної лози, злаків та ін.; 4) суміцидин (фенвалерат, α -ціано-*n*-феноксibenзил-ізопропіл-*p*-хлорвінілацетат) – світла рідина, для боротьби зі шкідниками фруктових і овочевих культур, сої, кукурудзи, картоплі, бавовнику, тютюну та ін.

Методи їх ідентифікації та визначення вмісту в пробі, що аналізується, базуються на їх екстракції органічним розчинником, очищенні екстрактів та наступним газорідиннохроматографічним детектуванням.

Матеріали для дослідження: овочі, фрукти, зелена маса.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: газорідинний хроматограф з детектором електронного захоплення; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; мікроподрібнювач проб (блендер); водяна баня; пристрій для упарювання (ротаційний випарник); хроматографічна скляна колонка для очищення екстрактів (довжина 30 см, діаметр 1,5 см); апарат для струшування типу «Вортекс»; дистильована вода; ацетон; гексан; бензол; ацетонітрил; алюмінію оксид; безводний натрію сульфат; натрію хлорид; 5 % ПМС на хроматоні №-AW HDMS для створення нерухомої фази; азот газоподібний стиснений 99,999 %-вий – рухома фаза; високоочищені кристали піретроїдів (амбулаш, децис, ринкорд і суміцидин); ділільна лійка ємністю 250 см³; конічні колби ємністю 250 см³; грушоподібна колба ємністю 250 см³;

мікрошприц або мікропіпетка об'ємом 10 мм³; вата; фільтрувальний папір (синя стрічка) та все необхідне для фільтрування.

Хід роботи:

Включають газорідний хроматограф в електромережу і встановлюють параметри аналізу згідно з «Інструкцією щодо експлуатації». Дають йому вийти на режим і прогрівають 30 хв.

Проби відбирають відповідно до існуючих правил відбору проб сільськогосподарської продукції та харчових продуктів для ідентифікації і визначення вмісту пестицидів.

Наважку 25 г дрібноподрібненої проби, яка аналізується, поміщають у ділильну лійку з притертим корком, заливають 50 см³ суміші ацетон:вода (1:1) і струшують 1 год. Після відстоювання, відділяють ацетонову фракцію, яка містить органічний екстракт проби. Екстракцію повторюють тричі. Екстракти об'єднують, фільтрують через паперовий складчастий фільтр у конічну колбу і поміщають у холодильник (приблизно 4 °С) на 1 год. Після випадання осаду, пробу фільтрують повторно. Фільтрат переносять в ділильну лійку і додають 30 см³ гексану для екстракції піретроїдів. Після струшування 10 хв відокремлюють гексан. Екстракцію з водного розчину проводять ще два рази з 30 см³ гексану. Гексанові фракції об'єднують, сушать безводним натрію сульфатом і концентрують на ротаційному випарнику до об'єму 0,3–0,5 см³ при температурі водяної бані 35–40 °С, а потім на повітрі насухо. Сухий залишок у колбі розчиняють в 1 см³ гексану і проводять додаткове очищення на скляній хроматогра-фічній колонці (довжина 30 см, діаметр 1,5 см). На її дно поміщають тампон із вати, насипають 4 г безводного натрію сульфату, 5 г алюмінію оксиду і зверху знову 2 г безводного натрію сульфату.

У подальшому колонку промивають 40 см³ бензолу і елюат відкидають, а до неї вносять 1 см³ розчину, який містить концентрований гексановий екстракт. Йому дають можливість увібратися у фільтрувальний шар, який

поміщений в колонку, а потім проводять елюювання піретроїдів 50 см³ бензолу. Цей елюат випарюють насухо на ротаційному випарнику. Отриманий сухий залишок розчиняють у 1 см³ гесану і хроматографують.

Для цього використовують газорідинний хроматограф із детектором електронного захоплення, колонкою довжиною 1 м і діаметром 3 мм. Рухома фаза – стиснений азот газоподібний, нерухома фаза – ПМС-100 (5 %-вий на хромотоні №-AW HDMC). Об'єм проби, яка аналізується – 5 мм³.

Нижня межа визначення амбушур – 10 нг, децису – 5 нг, ринкорду – 3 нг, суміцидину – 5 нг.

Приготування стандартних розчинів піретроїдів

Наважку 1 мг кристалічних піретроїдних пестицидів (амбушу, децису, ринкорду і суміцидину) розчиняють у 10 см³ гексану. Масова концентрація піретроїдів в основному стандартному розчині буде 100 мкг/см³. Його зберігають при температурі не менше 0 °С і не довше 6 місяців.

Робочий стандартний розчин 10 мкг/см³ готують розведенням основного стандартного розчину в 10 разів гексаном. Об'єм робочої стандартної проби, що вводиться в хроматограф, як і аналізуючої проби, 5 мм³.

Проведення розрахунків

Результати (хроматограма), які отримані для проби, що аналізується, порівнюють із такими для робочих стандартних розчинів. За часом отримання піків на хроматографі ідентифікують конкретні штучні піретроїди, а за площею піків – визначають їх масову частку в пробі.

Масову частку кожного штучного піретроїдного пестициду обчислюють за формулою:

$$C_x = \frac{C_{ст.} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст.} \cdot V_1 \cdot m},$$

де C_x – масова частка піретроїду в пробі, що аналізується (мг/кг або мг/дм³);

$C_{ст.}$ – концентрація піретроїду в робочому стандартному розчині (мкг/см³);

$S_{ст.}$ – площа піку на хроматограмі робочого стандартного розчину піретроїду (мм²);

- S_x – площа піку на хроматограмі піретроїду, який ідентифікується (мм^2);
 V_1 – об'єм екстракту, введеної в хроматограф проби, що аналізується (мм^3);
 V_2 – об'єм екстракту проби, що аналізується, після концентрування (см^3);
 m – маса наважки (або об'єм) проби, що аналізується (г або см^3);

При відсутності інтегратора у складі хроматографа, площу хроматографічного піку (S , мм^2) розраховують за формулою:

$$S = h \cdot a_{0,5},$$

- де h – висота піку (мм);
 $a_{0,5}$ – ширина, яка виміряна на половині висоти (мм).

Якщо неможливо вирахувати площу піків (мають малу ширину і відсутній інтегратор), то можна скористатися тільки висотою піків (мм), хоча цей прийом менш точний.

Якщо пік піретроїду на хроматограмі проби, що аналізується, виходить за межі повної шкали самописця, то для повторного аналізу необхідно зменшити об'єм цієї проби (V_4), що вводиться в хроматограф, або розбавити цей розчин (V_3) гексаном і в хроматограф ввести його аліквоту.

Лабораторна робота 2.11. Визначення вмісту залишків дихлордифенілтрихлорметилметану (ДДТ) у борошні методом газової хроматографії.

Принцип методу. Дихлордифенілтрихлорметилметан, відомий як ДДТ або дуст, високотоксичний інсектицид, що дуже широко застосовувався в 40–60-х роках ХХ століття для боротьби з комахами в сільському господарстві та у побуті. Завдяки високій стійкості (зберігається в природних умовах десятиліття) і леткості цей пестицид є одним з найглобальніших забруднювачів. Він здатний акумулюватися і передаватися харчовими ланцюгами, проявляє мутагенну дію, вражає серцево-судинну, нервову,

ендокринну, кровотворну, дихальну і травну системи, спричинює онкозахворювання. Це спричинило заборону використання ДДТ (в колишньому СРСР у 1970 р.), але, не зважаючи на це, і зараз ґрунт є джерелом його надходження у рослини, в тому числі в зернові культури.

Метод визначення ДДТ у борошні базується на його екстракції органічним розчинником, концентруванні екстракту і наступному газохроматографічному детектуванні.

Матеріали для дослідження: борошно вищого сорту.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: газовий хроматограф з полум'яно-іонізаційним детектором; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; водяна баня, віброзмішувач, повітряний холодильник; сульфатна кислота (розчин з концентрацією 6 моль/дм³); гексан; розчин три фенілфосфіну у гексані (1,31 мг/см³); дистильована вода; круглодонна колба ємністю 500 см³; мірна колба ємністю 50 см³; ділильні лійки ємністю 250 см³; мірні циліндри ємністю 20 і 200 см³; мікрошприц або мікропіпетка ємністю 10 мм³.

Хід роботи:

Включають газовий хроматограф в електромережу і встановлюють параметри аналізу згідно з «Інструкцією щодо експлуатації». Дають йому вийти на режим і прогрівають 30 хв.

У круглодонну колбу поміщають 25 г борошна і додають 20 см³ розчину сульфатної кислоти (6 моль/дм³). Вміст колби ретельно струшують і охолоджують під струменем холодної води. Після цього в колбу додають 20 см³ гексану і 200 см³ дистильованої води. Після приєднання до колби повітряного холодильника, її вміст нагрівають до кипіння. Отриманий відгін збирають у ділильну лійку. Шар органічної фази поміщають у мірну колбу, а водяну фазу переносять у другу ділильну лійку. В цю лійку додають 5 см³ гексану та перемішують віброзмішувачем 15 хв. Подібну операцію (екстракцію) повторюють три рази і отримані кожний раз екстракти додають

у мірну колбу, яка містить перший екстракт. Об'єднані екстракти в мірній колбі ємністю 50 см³ доводять до мітки гексаном і ретельно перемішують. У подальшому мікрошприцем або мікропіпеткою відбирають 5 мм³ екстракту і додають такий же об'єм свіжоприготовленого розчину внутрішнього стандарту, яким є розчин трифенілфосфіну в гексані (1,31 мг/см³), і ретельно перемішують. Отримані 10 мм³ суміші проби і внутрішнього стандарту вводять у випарник хроматографа та проводять хроматографію. Подібну операцію проводять також із робочим стандартом ДДТ: у випарник хроматографа вводять суміш, яка за об'ємом містить 5 мм³ робочого стандарту і 5 мм³ внутрішнього стандарту (розчину трифенілфосфіну в гексані; 1,32 мг/см³).

Умови хроматографії: скляна колонка довжиною 1,0 м і діаметром 0,3 мм; носій – унтертон-супер; нерухома фаза – метилсиліконовий еластомер OV – 17,5 % від маси твердого носія; газ-носій – стиснений азот 99,999 %-вий; швидкість газу-носія – 60 см³/хв; температура колонки – 150–250 °С; детектор – полум'яно-іонізаційний; температура детектора і випарника – 300 °С.

Приготування стандартних розчинів ДДТ

Наважку 100 мг ДДТ розчиняють у 10 см³ гексану. Масова концентрація ДДТ в основному стандартному розчині буде 10 мг/см³. Його зберігають при температурі нижче 0 °С не довше 6 місяців.

Робочий стандартний розчин із концентрацією ДДТ 1 мг/см³ готують розведенням основного стандартного розчину в 10 разів гексаном. За необхідності, таким же чином із нього можна отримати робочий стандартний розчин із концентрацією ДДТ 100 мкг/см³.

Проведення розрахунків

Результати досліджень (хроматограма) для проби, що аналізується, і робочого стандарту порівнюють між собою. За часом утримання піків на

хроматограмі ідентифікуюють піки ДДТ, а за площею піків – визначають масову частку ДДТ у пробі, яка аналізується.

Масову частку ДДТ за однакових об'ємів робочого стандартного розчинів і проби, які введені в хроматограф (у нашому випадку це так, а саме по 5 мм³), обчислюють за формулою:

$$C_x = \frac{C_{ст.} \cdot S_x \cdot 1000}{S_{ст.} \cdot m},$$

де C_x – масова частка ДДТ у пробі, що аналізується (мг/кг);

$C_{ст.}$ – кількість ДДТ у стандарті-пробі (мг);

S_x – площа піку на хроматограмі ДДТ аналізованої проби (мм²);

$S_{ст.}$ – площа піку на хроматограмі ДДТ у пробі-стандарті (мм²);

m – маса наважки проби борошна, яка взята для аналізу (г);

1000 – коефіцієнт перерахунку грамів (г) у кілограми (кг).

При відсутності інтегратора у складі хроматографа, площу хроматографічного піку (S , мм²) розраховують за формулою:

$$S = h \cdot a_{0,5},$$

де h – висота піку (мм);

$a_{0,5}$ – ширина, яка виміряна на половині висоти (мм).

Лабораторна робота 2.12. Визначення вмісту бензойної та сорбінової кислот методом високоефективної рідинної хроматографії.

Принцип методу. Харчові добавки – це природні або штучні сполуки, які цілеспрямовано вводяться в харчову сировину або готові харчові продукти з технологічних міркувань з метою збереження або зміни природних чи заданих властивостей харчових продуктів.

Одним із найпоширеніших консервантів є бензойна (Е 210) і сорбінова (Е 200) кислоти.

Метод визначення вмісту бензойної та сорбінової кислот базується на їх вилученні з харчового продукту перегонкою з паром і екстракцією органічним розчинником етилацетатом із наступним хроматографічним розділенням цих кислот у тонкому шарі сорбенту, елюації і вимірюванні екстинкції (оптичної густини) отриманих елюатів, а також градуювальних розчинів.

Матеріали для дослідження: харчовий продукт (шинка, ковбаса, твердий сир, фруктовий сік).

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: рідинний хроматограф з УФ-детектором (довжина хвилі 272 нм), автоматичною системою обробки даних або інтегратором, колонкою довжиною 250 мм і внутрішнім діаметром 4,6 мм; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; піщана баня; пристрій для упарювання (ротаційний випарник); прилад для переганяння з паром і нагрівачами; ножиці; нагрівальний прилад (плитка); дистильована вода; етилацетат; безводний натрію сульфат; сульфатна кислота (1 моль/дм³ водний розчин); мікрошприц або мікропіпетка об'ємом 10 мм³; мірний циліндр ємністю 10 см³; мірні колби ємністю 25 і 100 см³; конічні колби ємністю 100 і 1000 см³; ділильні лійки ємністю 100 см³; пробірки ємністю 10 см³; градуювальні піпетки; мікрошприц або мікропіпетка об'ємом 10 мм³; універсальний паперовий рН-індикатор.

Хід роботи:

Включають рідинний хроматограф в електромережу. Встановлюють параметри аналізу згідно з «Інструкцією щодо експлуатації». Дають приладу вийти на режим і прогрітися 30 хв.

Перед початком роботи готують градуювальні розчини бензойної і сорбінової кислот. Для цього наважку 100 мг бензойної кислоти переносять у мірну колбу ємністю 25 см³ і доводять до мітки етилацетатом (концентрація отриманого розчину 4 мг/см³), а наважку 40 мг сорбінової кислоти – у мірну

колбу ємністю 100 см^3 і доводять до мітки теж етилацетатом (концентрація отриманого розчину $0,4 \text{ мг/см}^3$). В подальшому рівні об'єми цих розчинів (можна по 1 см^3) змішують. Концентрація в отриманому розчині бензойної кислоти – $2,0 \text{ мг/см}^3$, а сорбінової – $0,2 \text{ мг/см}^3$. Отримані стандартні розчини зберігають у холодильнику ($2\text{--}4 \text{ }^\circ\text{C}$) не більше 6 місяців.

Проба, яка аналізується (шинка, ковбаса, твердий сир тощо, але не напої), масою 10 г подрібнюють ножицями і гомогенізують із добавкою 25 г натрію сульфату і 40 см^3 сульфатної кислоти з концентрацією 1 моль/ дм^3 . Гомогенат переносять при змиві дистильованою водою у колбу ємністю 1 дм^3 , яка з'єднана з пароутворювачем і нагрівають.

У момент, коли рідина в колбі починає кипіти, пароутворювач закривають корком і відгоняють бензойну і сорбінову кислоти з паром; при цьому 80 см^3 дистилату в приймач, що містить 10 см^3 натрію гідроксиду з молярною концентрацією 1 моль/ дм^3 . Дистилат переносять у ділильну лійку, насичують безводним натрію сульфатом (на 10 см^3 дистилату додають 6 г натрію сульфату), підкисляють розчином сірчаної кислоти (1 моль/ дм^3) до рН $2,0\text{--}3,0$. Потім отриманий розчин екстрагують тричі по 10 см^3 етилацетатом. Екстракти об'єднують і сушать при додаванні 2 г прожареного безводного натрію сульфату. Отриманий об'єднаний екстракт упарюють на ротаційному випарнику (можна це зробити в порцеляновій чашці на піщаній бані) до кінцевого об'єму 1 см^3 .

При аналізі напоїв 10 см^3 його розбавляють удвічі сірчаною кислотою з молярною концентрацією $0,5 \text{ моль/дм}^3$, додають 10 г без-водного натрію сульфату, інтенсивно перемішують і екстрагують бензойну та сорбінову кислоти тричі по 10 см^3 етилацетатом. Об'єднані екстракти сушать при додаванні 1 г прожареного безводного натрію сульфату. Отриманий об'єднаний екстракт упарюють на ротаційному випарнику (або в порцеляновій чашці) до об'єму 1 см^3 .

Екстракт, який отримують після упарювання, а також калібрувальний розчин бензойної і сорбінової кислот (див. вище) хроматографують за умов: рухома фаза – суміш 0,025 моль/дм³ натрію ацетату: рН 4,5-ацетонітрил (8:2); швидкість рухомої фази – 1,0 см³/хв; нерухома фаза – *Kromasil 5 мкм C18*. Об'єм проби, що вводиться – 10 мм³ (якщо висота піку виходить за межі шкали хроматографа, об'єм проби зменшують принаймні у два рази).

Проведення розрахунків

Результати дослідження (хроматограми) проби, що аналізується, та стандартів (хроматограми) порівнюють між собою. За часом отримання піків на хроматограмі ідентифікують піки бензойної і сорбінової кислот, а за площею піків визначають масову частку цих кислот у пробі. Масову частку окремо бензойної і сорбінової кислот обчислюють за формулою:

$$C_x = \frac{C_{см.} \cdot S_0 \cdot V_1 \cdot K}{S_{см.} \cdot m} \cdot 1000,$$

де C_x – масова частка бензойної або сорбінової кислоти в пробі, що аналізується (мг/кг або мг/дм³);

$C_{см.}$ – концентрація бензойної або сорбінової кислоти в стандарт-ному розчині (мг/см³);

S_0 – площа піку бензойної або сорбінової кислоти на хромато-грамі екстракту (мм²);

$S_{см.}$ – площа піку бензойної або сорбінової кислоти на хромато-грамі стандартів (мм²);

V_1 – об'єм екстракту (см³);

m – маса зразка (г) або об'єм напою (см³), що взято для аналізу;

K – коефіцієнт, що враховує ступінь витягу бензойної або сорбінової кислоти, його визначають експериментально при порівнянні результатів аналізу стандартних розчинів та еталонного зразка з відомим вмістом бензойної або сорбінової кислот;

1000 – коефіцієнт перерахунку за методикою.

За кінцевий результат випробувань приймають середнє арифметичне трьох паралельних визначень. Остаточний результат округлюють до першого десяткового знаку.

При відсутності інтегратора у складі хроматографа площу хроматографічного піку (S , мм²) розраховують за формулою:

$$S = h \cdot a_{0,5},$$

де h – висота піку (мм);

$a_{0,5}$ – ширина, яка виміряна на половині висоти (мм).

Лабораторна робота 2.13. Визначення вмісту поліхлорованих біфенілів у воді методом газової хроматографії.

Принцип методу. За допомогою вуглеводневого розчинника зі зразків води методом «рідина – рідина» екстрагують ПХБ, концентрують, а за необхідності очищують. Отримані проби екстрактів, які містять ПХБ, аналізують методом газової хроматографії із застосуванням електронзахоплюючого детектора (ЕЗД) або, за необхідності, більш чутливого мас-спектрометричного детектора (МСД).

Якісно і кількісно визначають ПХБ порівнюючи відносні часи утримування і відносні площі (висоту) піків досліджуваних ПХБ щодо стандартів цих сполук.

Матеріали для дослідження: природна і питна вода.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: газовий хроматограф з електронзахоплюючим детектором (ЕЗД), газ-носії азот особливої чистоти (99,99%), а за необхідності розширення можливостей (в першу чергу чутливості, точності та розрішальної здатності) – мас-спектрометричний детектор (МСД), газ-носії гелій особливої чистоти (99,99%), придатні капілярні колонки, а саме скляні чи з кварцового скла

довжиною від 25 м до 60 м, із внутрішнім діаметром 0,32 мм та вкрита плівкою (нерухомою фазою) для розділення ПХБ (див. нижче), система обробки даних з відповідним програмним забезпеченням, водяна баня, терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межою зважування 200 г, магнітний блок для змішування з мішалками, міросепаратор, ротаційний випарювач, ексікатор; екстрагувальний розчинник (гексан, петролейний етер або гептан), декан чи до декан, безводний натрію сульфат, сухий алюмінію оксид і дезактивований алюмінію оксид (до 10 г сухого алюмінію оксиду додають 0,7 см³ дистильованої води, струшують і поміщають в закриту склянку колбу, час зберігання – не більше 1 тижня), оксид алюмінію з срібла нітратом (розчиняють 0,75 г срібла нітрату в 0,75 см³ дистильованої води, додають 4,0 см³ ацетону і 10 г дезактивованого алюмінію оксиду, ретельно змішують в конічній колбі місткістю 50 см³, а ацетону дають можливість випаритися; час зберігання – не більше 4 год після приготування), толуол, діетиловий етер, силікагель (розмір частинок від 60 до 200 мкм; зберігають не більше 2 год в закритій колбі, яку поміщають в ексікатор), стандартні (контрольні) розчини ПХБ, дистильована вода і спеціально очищена, наприклад, методом іонообміну або в колонії з активованим вугіллям; сепараційна лійка, ділільна лійка місткістю 100 і 500 см³, мірні пробірки місткістю 1 см³, градуювальні піпетки або дозатори місткістю 0,5 – 5,0 см³, шприци для газового хроматографа місткістю 1 і 5 мм³, штатив для пробірок, вата безводна або скловата.

Хід роботи:

Перед початком роботи проводять ряд попередніх операцій, а саме:

Відбирання і приготування проб досліджуваної води. Проби досліджуваної води відбирають у темні скляні пляшки з пришліфованими колпачками, або які закручуються, номінальною місткістю від 1 до 5 дм³. Наповнюють пляшки від 80% до 90%.

Екстрагування і розділення проб проводять одним із способів:

1. Екстрагування в контейнері для проб і розділення в сепараційній лійці.

2. Естрагування в контейнері для проб з магнітною мішалкою і сепарація в мікросепараторі.

3. Естрагування збовтуванням: додають 30 см³ розчинника для екстрагування (гексана, петролейного етеру або гептану) до проби в скляній пляшці, збовтують як мінімум 10 хв. і переносять в ділильну лійку необхідної місткості. Утворену після відстою нижню водну фазу зливають у ротаційний випарювач для концентрування (див. нижче). Повторюють екстрагування двічі, додаючи по 30 см³ екстрагуювального розчину.

4. Екстрагування замороженням: екстракт заморожують за температури – 18 °С на 2 год. З утвореного льоду зливають екстракт розчинника і переносять його у випарювач для концентрування (див. нижче). Лід ще зливають 10 см³ розчинника, змив додають у ротаційний випарювач.

Екстракт концентрують наступним чином: у колбу з екстрактом додають 0,5 – 1 г безводного натрію сульфата і збовтують 1 хв, а потім залишають на 5 хв. і зливають екстракт у ротаційний випарювач, який встановлюють на ще ненагріту водяну баню, яку нагрівають після встановлення ротаційного випарювача до температури 50°C. Після того, як закінчився процес концентрування проби (як правило, до об'єма 0,5 см³) екстракт переносять в мірну пробірку місткістю 1 см³. Ретельно промивають стінки посудини для випарювання невеликої (не більше 0,5 см³) кількості екстрагуювального розчину. Змив переносять у мірну пробірку з концентрованим розчином досліджуваної проби, який і застосовується (аліквота) для аналізу з попереднім, якщо треба, очищенням концентрованих екстрактів.

Використовують одну чи обидві з нижченаведених процедур:

1. екстракти пропускають через колонку з алюмінію оксидом і срібла нітрату (див. вище) для видалення полярних сполук (процедура наведена нижче при розгляді підготовки колонки);

2. екстракти пропускають через колонку з силікагелем для відокремлення ПХБ від більшості хлорорганічних пестицидів (процедура наведена нижче при розгляді підготовки колонки).

Приготування стандартних розчинів ПХБ. Даним методом досліджуються наступні ПХБ – 2,4,4'-трихлорбіфеніл (ПХБ28); 2,2',5,5'-тетрахлорбіфеніл (ПХБ52); 2,2',4,5,5'-пентахлорбіфеніл (ПХБ101); 2,2',3,4,4',5'-гексахлорбіфеніл (ПХБ138); 2,2',4,4',5,5'-гексахлорбіфеніл (ПХБ153); 2,2',3,4,4',5,5'-гептахлорбіфеніл (ПХБ 180); 2,2',3,3',4,4',5,5'-октахлорбіфеніл (ПХБ194). Саме їх сертифіковані стандарти повинні бути для приготування проміжних, а з них робочих, розчинів ПХБ.

Проміжні стандартні розчини готують розведенням основних розчинів екстрагувальним розчинником (гексаном, петролейним етером або гептаном). Типова їх концентрація 10 мкг/см³. Зберігають ці розчини при 4°C без доступу світла не більше 6 місяців.

Готують не менше п'яти робочих розчинів стандартів із розрахунку, що концентрація досліджуваного ПХБ попадає (краще в середину) робочої межі стандартів. Чутливість даного методу від 1 до 50 нг/см³. Зберігають робочі розчини стандартів при 4 °C без доступу світла не більше місяця.

Приготування «холостої» проби. Виконують весь процес (попереднє очищення, екстрагування, концентрування, очищення, газохроматографічне аналізування) зі спеціально очищеною водою методом іонообміну або в колонці з активованим вугіллям (див. вище).

Проведення газОВО-хроматографічного аналізу. Газову хроматографію досліджуваних проб і стандартів проводять з урахуванням даних «холостої» проби (проби на реактиви і процеси) згідно «Інструкції по

експлуатації» конкретного газового хроматографа та детектора (ЕЗД або МСД).

Попередньо підготовлюють хроматографічну колонку. Спочатку на колонку із алюмінію оксидом і срібла нітрату наносять $15,0 \text{ см}^3$ екстракційного розчину (гексану, петролейного етеру або гептану), додають по 1 г алюмінію оксиду і срібла нітрату, дають осісти при легкому постукуванні по колонці. В подальшому додають в колонку достатню кількість безводного натрію сульфату, щоб одержати 5 мм верхнього шару. Потім зливають надлишок екстрагуючого розчинника. Коли рівень розчинника досягає верхньої частини колонки, додають концентрований екстракт проби.

При підготовці колонки з силікагелем, його спочатку дезактивують додаванням дистильованої води, а потім 1 г суспендують (готують суспензію) такої консистенції, щоби її можна було піпеткою переносити у хроматографічну колонку. Чекають, поки силікагель осяде під час постійного вібрування колонки, щоб утворився щільний шар.

В подальшому на шарі силікагелю в колонці наносять 0,2 г безводного натрію сульфату і колонку промивають 5 см^3 розчинника.

Калібрування хроматографа проводять згідно «Інструкції по експлуатації» конкретного приладу.

Ідентифікування індивідуальних сполук ПХБ проводять по співставленню з положенням на хроматограмі стандартів за часом утримання на колонці. Хроматографію досліджуваної проби (екстрактів) і стандартів проводять в однакових умовах.

Проведення розрахунків:

Масова концентрація i -тої речовини (ПХБ _{i}) в досліджуваній пробі (C_{ix} , нг/дм³) обчислюють за формулою:

$$C_{i_x} = \frac{C_{i_{ct.}} \cdot V_x \cdot V_{i_x}}{V \cdot V_{i_{ct.}}} \cdot \frac{S_{i_x}}{S_{i_{ct.}}},$$

де $C_{i_{ct.}}$ – масова концентрація стандарту ПХБ $_{i_{ct.}}$ (нг/дм³);

V_x – загальний кінцевий об'єм екстракту проби, який досліджується (дм³);

$V_{i_{ct.}}$ – об'єм розчину стандарту, який вводиться в інжектор хроматографа (мм³);

V – об'єм проби, який взятий для дослідження (дм³);

V_{i_x} – об'єм екстракту проби, який вводиться в інжектор хроматографа (мм³);

S_{i_x} – площа піку на хроматограмі проби, яка досліджується (мм²);

$S_{i_{ct.}}$ – площа піку на хроматограмі стандарту (мм²);

i – номер ПХБ $_i$.

Площу піків на хроматограмі (S), згідно прийнятої методики при відсутності автоматичної системи, обчислюють за формулою:

$$S = h \cdot a_{0,5},$$

де h – висота піку (мм);

$a_{0,5}$ – ширина піку на половині висоти (мм).

У випадку, коли ширину піка із-за того, що він дуже вузький (навіть при автоматичному обчисленні площі піку) неможливо визначити, то замість відношення площ піків ($S_{i_x}/S_{i_{ct.}}$) у вищенаведеній формулі наводять відношення висот піків ($h_{i_x}/h_{i_{ct.}}$).

Лабораторна робота 2.14. Визначення вмісту поліхлорованих біфенілів у жирових харчових продуктах методом газової хроматографії.

Принцип методу. Поліхлоровані біфеніли (ПХБ) як ліпофільні сполуки накопичуються в жировій тканині, і вже кров'ю розносяться до інших тканин

і оґранів. На ліпофільності ПХБ базується і їх екстрагування з досліджуваних об'єктів.

Після попередньої підготовки зразків жирових продуктів з них екстрагують органічними розчинниками ПХБ, концентрують, очищують і методом газової хроматографії з використанням електронзахоплюючого детектора (ЕЗД), а за необхідності мас-спектрометричного детектора (МСД), проводять якісне і кількісне визначення ПХБ, порівнюючи щодо стандартів цих речовин.

Матеріали для дослідження: зразки молока, м'яса, риби та продуктів з них, жовтки яєць.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: газовий хроматограф з електронзахоплюючим детектором (ЕЗД) і газом-носієм азотом особливої частоти (99,99 %), а за необхідності розширення можливостей (чутливості, точності, розрішальної здатності тощо) – мас-спектрометричний детектор (МСД) з газом-носієм гелем особливої чистоти (99,99 %), капілярна кварцева колонка довжиною 50 м, внутрішній діаметр 0,20 мм, товщина шару нерухомої фази фенілметилсилікону 0,24 мкм, а за використання фенілціанопропанметилсилікону – 1 мкм, система обробки даних хроматограми з відповідними програмним забезпеченням, екстракційні хроматографічні колонки (трубки), параметри яких залежать від об'єкта дослідження (див. нижче), терези аналітичні з діапазоном зважування від 0,01 г до 1000 г та від 0,1 мг до 1 г, центрифуга зі зачиняючими стаканами місткістю від 200 см³ до 500 см³, і числом обертів ротора до 2000 об./хв, а також з ожолодженням до -15 °С зі стаканами від 50 см³ до 300 см³ і числом обертів ротора до 3000 об./хв, ексікатор, здібнювачі харчових продуктів блендер або міксер, а також потужний типу гомогенізатор, апарат для струшування, магнітна мішалка, муфельна пічка, сушильна шафа з регульованою температурою від 30 °С до 250 °С, електрична пічка з підтримуванням регульованої температури від 30 °С до 100 °С, екстрагуючий

апарат з круглодонною колбою місткістю 500 см³, ротаційний випарювач з круглодонною колбою місткістю 500 см³ і водяною банею з регульованою температурою від 30 °С до 100 °С; органічні розчинники (гексан, гептан, петролейний етер) діметилформамід, ацетон, діетиловий етер, діхлорметан, метанол або етанол, буферний розчин гліцину: розчин гліцину в дистильованій воді молярної концентрації 0,2 моль/дм³, який містить розчин цинка сульфат з масовою часткою 2%, насичені водні розчини натрію хлористого, натрію сульфату з масовою часткою 2%, натрію або калію оксалат, водний розчин натрію сульфату з масовою часткою 2% безводний натрію сульфат, емульсія фермента: фосфоліпаза С 800 МЕ/см³ у водному розчині аміака сульфату 3,2 моль/дм³ (зберігають за температури 1 – 4 °С), суміш елюантів – петролейний етер і діетиловий етер в об'ємному співвідношенні 94:6, адсорбент для очищення елюата Elorisil® (від 150 мкм до 250 мкм), основні стандарти ПХБ: номери 28, 30, 44, 52, 101, 118, 138, 143, 153, 155, 180, 194 і 209 або суміш комерційних стандартів ПХБ Aroclors® (1242, 1254 і 1260), прокалений при 400 °С морський пісок, дистильована вода; дільні лійки місткістю 250 см³, 500 см³ і 1 дм³ з скляним або тетрафторетиленовим краном, мірні колби місткістю 5, 10 і 20 см³, колба з борсилікатного скла місткістю 250 см³, скляна фільтруюча лійка місткістю 100 см³ з скляною фільтрувальною пластинкою, парцелянова лійка Бюхнера діаметром 12 см, колба Ерленмейера місткістю 250 см³, круглодонні колби з шліфом місткістю 250 см³ і 500 см³, хімічні скляні стакани місткістю 100 см³, 500 см³ і 1 дм³, парцелянова ступка з товчком, градуйовані піпетки або дозатори місткістю 0,5 – 5,0 см³, мікрошприци для інжекції в газовий хроматограф місткістю 1 мм³ і 5 мм³, збористий паперовий фільтрат діаметром 10 см паперові круглі фільтри діаметром 12 см і 30 см, вата або скловата, які перед використанням промиті сумішшю гексана і ацетона в об'ємному співвідношенні 1:1.

Хід роботи:

Перед початком роботи готують ряд розчинів і проводять певні операції:

1. Приготування стандартних розчинів ПХБ. Готують спочатку концентровані первинні стандартні розчини ПХБ (див. вище) концентрацією $0,4 \text{ мг/см}^3$ в органічному розчиннику (гексані, гептані або петролейному етері, який буде використовуватися в подальшому), зважуючи 10 мг кожного стандарту і розчиняючи в 25 см^3 розчинника. На основі цих розчинів комбінацією сворюють робочий розчин (від 2 см^3 до 10 см^3) суміші стандартів (ПХБ 28, 30, 44, 52, 101, 118, 138, 143, 153, 155, 180, 194 і 209). Концентрація ПХБ в робочому стандартні суміші суміші ПХБ повинна бути не менше 10 мг/дм^3 . Головне, щоби індивідуальні ПХБ, які присутні у суміші робочого стандарту, повністю розділялися застосованим хроматографічним методом.

Можливе також використання як суміші стандартів комерційних стандартів Aroclors[®] (1242, 1254 і 1260). В якості внутрішнього стандарту, який додається перед аналізом досліджуваної проби (екстракту з харчового продукту, див. нижче) використовують ПХБ155, а другий, який не реагує з можливими ПХБ, що аналізуються, обирають серед ПХБ143 і ПХБ207.

Первинні та розведені стандартні розчини ПХБ зберігають у темному місці за температури $2 - 4 \text{ }^\circ\text{C}$.

2. Приготування «холостої» проби. Перед роботою із зразками харчових продуктів проводять «холосте» визначення (хроматографію) зі застосуванням тих же процесів і реактивів, що використовуються для дослідження кожного зразка харчового продукту.

Отримані результати хроматографії «холостих» проб використовують при аналізі досліджуваних зразків.

3. Попередня підготовка зразків харчових продуктів для хроматографічного аналізу. Готують зразка для аналізу одразу після їх отримання. Якщо це неможливо, зберігають зразки у придатному контейнері в умовах замороження за температури не менше $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

У разі, коли неможливо закінчити аналізування за день, необхідно зберігати екстракти протягом ночі в умовах замороження за температури не менше -18°C , а також можна у темному місці в холодильнику за температури 4°C у добре закритому контейнері, але не довше 12 год.

Зразки (їх екстракти) після зберігання обов'язково перевіряють, щоб гарантувати їх придатність після цього процесу.

Частка жиру аналізуючого зразку визначає можливу кількість накопичених ПХБ як ліпофільних сполук, але після екстракції ПХБ з жиру, він та інші можливі домішки, можуть заважати аналізу. Тому екстракти зразків очищують в залежності від природи зразків, властивостей екстрагувального розчинника та існуючих методик (див. нижче).

4. Методи екстракції ПХБ. Існує цілий ряд методів екстракції ПХБ з харчової продукції, що містить велику кількість жиру, у якому здатні накопичуватися ПХБ.

Екстракція ПХБ з молока. Один з способів екстракції ПХБ з молока наступний: 100 см^3 молока змішують з 100 см^3 метанола або етанолу і 1 г натрію чи калію оксалата в стакані центрифуги і перемішують. Потім додають 50 см^3 діетилового етера і струшують суміш 1 хв. Після цього додають ще 50 см^3 петролейного етеру і суміш знову струшують 1 хв. Центрифугують отриману суміш протягом 5 хв зі швидкістю обертання ротора 1500 об./хв. Органічну фазу переносять в ділійну лійку місткістю 1 дм³, яка містить 500 см^3 дистильованої води і 30 см^3 насиченого розчину натрію хлориду. Органічну фазу, яка залишалася в стакані центрифуги, два рази екстрагують з 50 см^3 суміші діетилового і петролейного етера в співвідношенні об'ємів 1:1 при струшуванні. Після кожного екстрагування суміш центрифугують. Змішують об'єднані органічні фази у ділійній лійці і обережно струшують. Водну фазу відкидають. Органічну фазу 2 рази промивають 100 см^3 дистильованою водою, і кожний раз водну фазу відкидають (при появі емульсії до органічної фази або дистильованої води

для промивки додають 5 см³ насиченого розчину натрію хлориду). Органічну фазу пропускають через хроматографічну колонку (трубу) довжиною 50 см і діаметром 20 мм з безводним натрію сульфатом. Елюат збирають у скляній хімічний стакан місткістю 500 см³. Для отримання залишків екстракту хроматографічну колонку (трубку) промивають невеликою кількістю (до 5 см³) петролейного етеру і видаляють розчинник з отриманого екстракту на киплячій водянній бані слабким струменем повітря або азоту.

Застосування безпосередньо екстракційної хроматографічної колонки (трубки). Перетерають у порцеляновій ступці 10 см³ молока з сумішю (100 г), яка складається з рівних частин морського піску і безводного натрію сульфату.

Отриману суміш засипають у вигляді верхнього шару в екстрагуючу хроматографічну колонку (трубку) довжиною 30 см і внутрішнім діаметром 22 мм, у якій на відстані 10 см від верху внутрішній діаметр розширюється до 50 мм. В цю колонку (трубку) знизу вже був вкладений шар скловати і шар безводного натрію сульфату висотою 2 см. Цю колонку (трубку) промивають 50 см³ сумішю гексана і ацетона в об'ємному відношенні 2:1. Елюат збирають і випаровують в ротаційному випарювачі за температури 50 °С. Розчинник, який залишився, видаляють слабким струменем азоту.

Суше молоко перед екстрагуванням переводять у стан суспензії, для чого 10 г молочного порошку змішують з 90 см³ дистильованої води до однорідного стану протягом 15 хв за температури від 40 °С до 50 °С. В наступному проводять операції, як описано вище зі зразком молока.

Екстрагування розділенням. В хімічному скляному стакані місткістю 1 дм³ змішують 100 г молока з 500 см³ суміші гексана і ацетона в об'ємному співвідношенні 2:1, суміш перемішують до однорідного стану протягом 4 хв. Після розділення фаз верхню органічну фазу переносять в ділільну лійку, яка містить 500 см³ водного розчину натрію сульфату з масовою часткою 2%. Нижню фазу зливають до 2 см³. Шляхом обертання ділільної лійки

видаляють залишок води на стінках лійки. Коли вся вода повністю буде зібрана в нижній частині лійки, її зливають і відкидають. Органічну фазу зливають у круглодонну колбу через лійку з скляною фільтрувальною пластиною, яка попередньо містить шар (приблизно 2 см) безводного натрію сульфата (кількість біля 20 г). Фільтрат випарюють в ротаційному випарювачі за температури 50 °С до об'єму 1 см³. Розчинник, який ще може залишитися, видаляють слабим струменем азоту.

Екстрагування центрифугуванням. Центрифугують 30 см³ молока (або 20 г суспензії сухого молока) протягом 10 хв при швидкості обертання ротора 2500 об./хв і переносять отримані вершки в хімічний скляний стакан місткістю 100 см³, який містить 6 г безводного натрію сульфату. Додають 30 см³ гексана і отриману суміш обережно гомогенізують протягом 10 хв. Фазу, яка містить гексан, фільтрують через шар скловати, на яку нанесений тонкий шар безводного натрію сульфата. Фільтрат випаровують до 1 см³ в ротаційному випарювачі за температури 35 °С, а розчинник, який ще може залишатися, видаляють слабким струменем азоту.

Екстракція ПХБ з вершкового масла. Один з способів наступний: зразок вершкового масла нагрівають в хімічному скляному стакані за температури від 50 °С до 60 °С до тих пір, поки жир не відділиться. Розплавлений жир фільтрують у хімічний стакан через сухий фільтрувальний папір або невеликий шар скловати.

Екстрагування розділенням. Гомогенізують 20 г вершкового масла з 250 см³ суміші гексана з ацетоном в об'ємному співвідношенні 3:1. Органічну фазу після струшування і відділення переносять в ділільну лійку з 250 см³ розчину натрію сульфату з масовою часткою 2 %. Після струшування органічну фазу переносять у круглодонну колбу ротаційного випарювача і випарюють за температури 50 °С до об'єму 1 см³. Розчинник, який ще може залишатися, видаляють слабким струменем азоту.

Екстрагування центрифугуванням. Нагрівають зразок вершкового масла масою 20 г в хімічному скляному стакані за температури 50 °С і центрифугують при швидкості обертання ротора 1000 об./хв. Розплавлений жир вершкового масла фільтрують через сухий фільтрувальний папір.

Екстракція ПХБ з сиру. Один із способів екстракції ПХБ з сиру наступний: сир змільчують і до 100 г цієї маси додають 100 см³ етанолу або метанолу та 2 г натрію чи калію оксалату та гомогенізують в блендері протягом 3 хв. Гомогенізовану пробу переносять у хімічний скляний стакан місткістю 500 см³, додають 50 см³ діетилового етеру і енергійно струшують протягом 1 хв. Центрифугують протягом 5 хв при швидкості обертання ротора 1500 об./хв. Органічну фазу переносять в ділильну лійку місткістю 1 дм³, в яку додано 500 см³ дистильованої води і 30 см³ насиченого розчину натрію хлориду. Водну фазу після струшування 1 хв відкидають, а органічну фазу 2 рази промивають 100 см³ дистильованою водою, і кожний раз водну фазу відкидають. Органічну фазу пропускають через хроматографічну колонку (трубку) довжиною 50 см і діаметром 20 мм з безводним натрію сульфатом. Зі зібраного екстракту і доданого до нього промивного розчину (петролейного етеру в кількості 5 см³) видаляють розчинник на кип'ячій водяній бані струменем повітря або азоту.

Екстрагування зі зворотним холодильником. Ретельно змішують від 10 г до 30 г (в залежності від вмісту жиру) дуже мілко змільченого сиру з подвійною кількістю безводного натрію сульфату. Суміш переносять в колбу Ерленмейера місткістю 250 см³ і послідовно екстрагують чотири рази порціями по 100 см³ суміші діхлорметана і ацетона в об'ємному співвідношенні 2:1 шляхом нагріву протягом 15 хв зі зворотним холодильником. Отриманий розчин випарюють в ротаційному випарювачі до сухого залишку. Залишок, що залишився, розчиняють в 20 см³ петролейного етеру і обережно переливають через невеликий шар скловати у кругло донну колбу місткістю 50 см³ і випарюють в ротаційному випарювачі за

температури 50 °С до об'єма 1 см³. Розчинник, який ще може залишитися, видаляють слабким струменем азоту.

Застосування екстракційної хроматографічної колонки (трубки). У порцеляновій ступці перетирають 10 г мілкозмільченого сиру з сумішшю (100г), яка складається з рівних частин морського піску і безводного натрію сульфату.

Отриману суміш додають у верхню частину екстрагуючої хроматографічної колонки (трубки) довжиною 30 см і внутрішнім діаметром 22 мм, у якій на відстані 10 см від верху внутрішній діаметр розширюється до 50 мм. Нижній край цієї колонки закритий скловатою, а в неї вже був доданий безводний натрію сульфат шаром, який має висоту 2 см.

Колонку промивають 50 см³ сумішшю гексана і ацетона в об'ємному відношенні 2:1. Елюат збирають і випаровують в ротаційному випаровувачі за температури 50 °С до об'єма 1 см³. Розчинник, який ще може залишитися, видаляють слабким струменем азоту.

Екстрагування центрифугуванням. Гомогенізованого 10 г сиру з 10 г безводного натрію сульфату і 50 см³ гексана центрифугують протягом 5 хв при швидкості обертання ротора 1500 об./хв. Отриманий надосадковий розчин переносять в круглодонну колбу ротаційного випарювача, а осад вдруге екстрагують 50 см³ гексану і теж екстракт переносять в ту ж колбу ротаційного випарювача. Об'єднані екстракти випаровують до об'єма 1 см³ за температури 35 °С, а розчинник, який може ще залишитися, видаляють слабким струменем азоту.

Екстракція ПХБ з м'яса і риби, їх продуктів. Екстракцію ПХБ з цих харчових продуктів проводять загальноприйнятими екстракційними методами.

Екстрагування зі зворотним холодильником. Змільчені 25 г проби (м'яса або риби, їх продуктів) розтирають в порцеляновій ступці з 100 г безводного натрію сульфату. Отриману суміш переносять в кругло донну колбу з

шліфом і чотири рази екстрагують порціями по 100 см³ петролейного етеру, який нагрітий до кипіння по 10 хв зі зворотнім холодильником. Об'єднані екстракти випарюють в ротаційному випарювачі за температури 50 °С до об'єму 1 см³. Розчинник, який ще може залишитися, видаляють з екстракту слабким струменем азоту.

Екстрагування центрифугуванням. Гомогенезують змільчені 20 г м'яса або риби з 10 г безводного натрію сульфату і 50 см³ гексану. Отриману суміш центрифугують протягом 5 хв при швидкості обертання ротора 1500 об./хв. Отриманий надосадковий розчин вносять в кругло донну колбу ротаційного випарювача, а осад вдруге екстрагують 50 см³ гексану і теж екстракт переносять в ту ж колбу. Об'єднані екстракти випарюють в ротаційному випарювачі за температури 35 °С до об'єму 1 см³, а розчинник, який ще може залишитися, видаляють слабким струменем азоту.

Екстракція м'яса і м'ясних продуктів спеціальним методом. Пробу масою 30 г гомогенізують у блендері і змільчений об'єкт дослідження переносять в хімічний скляний стакан місткістю 500 см³ з додаванням безводного натрію сульфату у кількості, яка дає можливість отимати розсипчасту суміш. Додають 300 см³ суміші гексана і ацетона в об'ємному відношенні 2:1 і гомогенізують в блендері 3 хв. Екстракт фільтрують за допомогою скляної лійки з шаром вати у ділильну лійку місткістю 1 дм³. Вдруге гомогенізують залишок проби в хімічному стакані з 150 см³ вже означеної суміші гексана і ацетона. Витриманий розчин фільтрують через шар вати у ділильну лійку. Додають 250 см³ розчину натрію сульфату з масовою часткою 2 % і струшують лійку протягом 1 хв. Після розділення фаз відкидають нижню водну фазу. Верхню (органічну) фазу проливають у ділильний лійці 250 см³ розчину натрію сульфата з масовою часткою 2 %. Відібрану верхню у ділильний лійці фазу пропускають через складну фільтруючу лійку, яка містить 20 г безводного натрію сульфату в круглдонну колбу ротаційного випарювача і розчин випарюють за

температури 50 °С до об'єму 1 см³, а розчинник, який ще може залишитися в екстракті видаляють слабким струменем азоту.

Екстракція ПХБ з риби спеціальним методом. Проби з тканин риби гомогенізують за допомоги блендера. Змішують 100 г гомогенізованої проби з 200 г безводного натрію сульфата. Додають 200 см³ суміші гексана і ацетона в об'ємному співвідношенні 3:1 і нагрівають на кип'ячій водяній бані зі зворотним холодильником протягом 20 хв. при постійному перемішуванні. Розчин переносять у ділильну лійку місткістю 1 дм³, яка містить 500 см³ натрію сульфату з масовою часткою 2 %. Екстрагування проводять вдруге два рази, додаючи кожний раз 150 см³ суміші гексана і ацетона в об'ємному співвідношенні 3:1. Екстракти об'єднують в ділильній лійці, яку після цього струшують 1 хв. і розділяють фази. Нижню водну фази відкидають, а органічну фазу ще раз промивають 500 см³ розчином натрію сульфату з масовою часткою 2 %. Органічну фазу, яка залишиться у ділильній лійці, фільтрують через скляну фільтрувальну лійку, що містить 15 г безводного натрію сульфату, в круглдонну колбу ротаційного випарювача і випарюють за температури 50 °С до об'єма 1 см³, а розчинник, який ще може залишитися в екстракті, видаляють слабким струменем азоту.

Екстракція ПХБ з тваринних жирів. Пробу жиру (20 г) нагрівають в хімічному скляному до температури 50 °С і розплавлений жир фільтрують через сухий паперовий фільтр. До розплавленого фільтрату додають 50 см³ гексану і центрифугують протягом 5 хв. при швидкості обертання ротора 1500 об./хв. Отриманий надосадковий розчин вносять в круглдонну колбу ротаційного випарювача, а осад вдруге екстрагують 50 см³ гексану і теж екстракт переносять в ту ж колбу випарювача. Об'єднання екстракту випаровують в ротаційному випарювачі за температури 50 °С до об'єма 1 см³, а розчинник ще може залишитися в екстракті, видаляють слабким струменем азоту.

Екстракція ПХБ з жовтка яєць. Екстракцію ПХБ з цього продукту проводять, як правило, кількома способами.

Застосування екстракційної хроматографічної колонки. Один з способів екстракції ПХБ зі жовтків яєць – це застосування хроматографічної колонки (трубки). Жовток яєць масою 20 г перетирають в парцеляновій ступці з 100 г суміші, яка містить у рівних частинах морський пісок і безводний натрію сульфат.

Отриману суміш додають у вигляді верхнього шару в екстракційну хроматографічну колонку (трубку) довжиною 30 см з внутрішнім діаметром 22 мм, яка на відстані 10 см зверху має розширення внутрішнього діаметра до 50 мм. В цю колонку (трубку) попередньо вкладений шар скловати і шар безводного натрію сульфату висотою 2 см. Екстрагуючу колонку (трубку) промивають 50 см³ сумішю гексана і ацетона в об'ємному співвідношенні 2:1. Елюат збирають і випарюють за температури 50 °С в ротаційному випарнику до об'єму 1 см³, а розчинник, який ще може залишитися в екстракті видаляють слабким струменем азота.

Екстрагування розділенням з обробкою фосфоліпазою С. Пробу жовтка масою 20 г гомогенізують і переносять в колбу із боросилікатного скла місткістю 250 см³ додають 10 см³ буферного розчину гліцину (див. вище) і 50 мм³ емульсії фосфоліпази С 800 МЕ/см³ в розчині аміака сульфату 3,2 моль/дм³. Суміш інкубують при температурі 37 °С протягом 2 год при легкому перемішуванні. Отриману суміш переносять в хімічний скляний стакан місткістю 500 см³ і додають 250 см³ суміші гексана і ацетона в об'ємному співвідношенні 3 : 1 та гомогенізують протягом 2 хв. Після розділення фаз відфільтровану органічну фазу через скляну лійку з невеличким шаром вати переносять в дільну лійку місткістю 500 см³, яка містить 250 см³ розчину натрію сульфату з масовою часткою 2 %. В хімічний стакан додають ще 50 см³ суміші гексана і ацетона в об'ємному співвідношенні 3:1 та після легкого струшування переносять теж в дільну

лійку, яку струшують 1 хв. Після розділення фаз видаляють нижню водну фазу, а краплини води, які залишаються на бокових стінках лійки, видаляють обертанням ділільної лійки. Верхню фазу фільтрують через скляну фільтрувальну лійку, яка містить 20 г безводного натрію сульфату. Отриманий розчин випаровують в ротаційному випарювачі за температури 50 °С до об'єма 1 см³, а розчинник, який не може залишитися в екстракті, видаляють слабким струменем азоту.

5.Очистка екстрактів харчових продуктів, які містять ПХБ. Очищення отриманих екстрактів харчових продуктів від супутніх ПХБ речовин, якими, зокрема, є жири та інші ліпіди, що можуть заважати аналізу. Для очищення екстрактів, які будуть аналізуватися, можна використовувати декілька методів, але найпоширенішими і рекомендованими є методи колонкової хроматографії на адсорбенті, зокрема з використанням комерційного активованого за спеціальною процедурою нагрівання і охолодження препарату Florisil[®], який із-за високої з'вязуючої здатності ліпідів використовується як адсорбент.

Очистка елюатів з харчових продуктів, які містять ПХБ, на хроматографічній колонці (трубці) з Florisil[®]. Існує декілька методичних підходів використання колонкової хроматографії з Florisil[®]. Один з них наступний. Використовують хроматографічну колонку (трубку) довжиною 30 см, внутрішній діаметр 22 мм, з політетрафторетиленовим краном і пористим скляним фільтром або тампоном з скловати. В цю колонку (трубку) поміщають шар активованого Florisil[®] висотою 10 см³ а також шар безводного натрію сульфату висотою теж 10 см і 50 см³ петролейного етеру. Під колонкою розміщують круглодонну колбу – приймач ротаційного випаровувача. Додають в колонку (трубку) екстракт з харчового продукту, що містить ПХБ, і проводять елюювання зі швидкістю не більше 5 см³/хв. Елюат концентрують до об'єма 1 см³ (а за необхідності концентрації до меншого)

випарюванням, а розчинник, який ще може залишатися в елюаті, видаляють слабким струменем азоту.

Інший метод очистки екстрактів харчових продуктів, які містять ПХБ, з використанням Florisil® наступний. Хроматографічну колонку (трубку) довжиною 50 см, внутрішнім діаметром 20 мм, з політетрафторетиленовим краном і пористим скляним фільтром або скловатою наповнюють до половини петролейним етером. Через лійку невеликими порціями в колонку додають 30 г Florisil®. На шар Florisil® поміщають шар безводного натрію сульфату товщиною 2 см, а петролейний етер зливають до рівня 2 мм над рівнем заповнення колонки.

Екстракт з харчового продукту, який містить ПХБ, вносять в колонку (трубку). Зливають петролейний етер до рівня не більше 2 мм над рівнем заповнення колонки (трубки).

В колонку (трубку) вносять 200 см³ суміші елюента (див. вище, петролейний етер і діетиловий етер в об'ємному співвідношенні 94:4) зі швидкістю 5см³/хв. і знову зливають до тих пір, поки рівень рідини не буде на відмітці 2 мм над рівнем заповнення колонки (трубки).

Отриманий елюат розбавляють 5 см³ гексану і концентрують випарюванням в ротаційному випарювачі до об'єму 5 см³ (а, за необхідності концентрації – до меншого об'єму).

Отримані очищені екстракти харчових продуктів викладеними вище методиками з використання Florisil® або за необхідності іншими концентрують, як правило, випарюванням.

6. Проведення газово-хроматографічного аналізу. Хроматографічне визначення ПХБ в пробах зразків харчових продуктів і розчинах стандартів проводять згідно «Інструкції по експлуатації» конкретного газового хроматографа і детектора (ЕЗД або МСД) з врахуванням результатів «холостої» проби (проби на реактиви і процеси).

Використання МСД, як більш чутливого детектора порівняно з ЕЗД, дозволяє визначити аналізуючі речовини, в тому числі ПХБ, в нанограмовому діапазоні, не потребує у багатьох випадках необхідності концентрувати більшість екстрактів, які аналізуються.

Інжектують (вводять) в газовий хроматограф необхідний об'єм (як правило, від 1,0 мм³ до 5 мм³ в залежності від системи) очищених і за необхідності сконцентрованих екстрактів, які отримані у відповідності зі застосованими методиками. Отримана хроматограма повинна дозволити як ідентифікувати, так і визначити концентрацією ПХБ в екстрактах. Якісне визначення досліджуваних ПХБ проводять по визначеному часу їх утримування в колонці по хроматограмі, а кількісне – по виміру площі або висоти піків.

Очікуваний вмість аналізованих ПХБ в досліджуваних пробах повинен бути в діапазоні концентрацій стандартів. Хроматографічне визначення як досліджуємих проб, так і проб-стандартів необхідно проводити суворо в однакових умовах, а також для підтвердження ідентичності результатів користуватися внутрішнім стандартом (див. вище).

Необхідно переконатися, що всі виміри проводяться в лінійному динамічному діапазоні застосованої хроматографічної системи.

Проведення розрахунків:

Масову концентрацію *i*-го поліхлорованого біфеніла (ПХБ_{*i*}) в досліджуваному зразку харчового продукту (C_{ix} , нг/кг (дм³)) обчислюють за формулою:

$$C_{ix} = \frac{C_{i_{cm.}} \cdot m_x (V_x) \cdot V_{ix}}{m(V) \cdot V_{i_{cm.}}} \cdot \frac{S_{ix}}{S_{i_{cm.}}}$$

де $C_{i_{cm.}}$ – масова концентрація стандарту ПХБ_{*i*}, нг/кг (дм³);

$m_x (V_x)$ – загальна кінцева маса (об'єм) екстракту проби, який досліджується, кг (дм³);

V_{i_x} – об'єм екстракту проби, що досліджується, який вводиться в інжектор хроматографа, мм³;

$m(V)$ – маса (об'єм), який взятий для дослідження, кг (дм³);

$V_{i_{cm}}$ – об'єм розчину стандарта, який вводиться в інжектор хроматографа, мм;

S_{i_x} – площа піку на хроматограмі проби, яка досліджується;

$S_{i_{cm}}$ – площа піку на хроматограмі стандарта;

i – номер ПХБ_{*i*}.

Примітка: досліджувані зразки можуть бути в рідкому або твердому агрегатному стані, тому у формулі вказані маса або об'єм зразка, а саме $m(V)$.

Площу піків на хроматографі (S) згідно прийнятті методики при відсутності автоматичної системи обробки даних, обчислюють за формулою:

$$S = h \cdot a_{0,5} ,$$

де h – висота піку, мм;

$a_{0,5}$ – ширина піку на половині висоти, мм.

У випадку, коли ширину піка внаслідок того, що він дуже вузький не можливо визначити, то замість площі піків (S) у вищенаведеній формулі наводять відношення висот піків ($h_{i_x}/h_{i_{cm}}$).

3. ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ МЕТОДИ

Електрохімія – це розділ фізичної хімії, який пов'язаний з електричними і хімічними процесами, явищами на міжфазних межах за участі електрично заряджених частинок (електронів та іонів). *Електрохімічні методи* – це група методів якісного і кількісного аналізу речовин, в основі яких лежать електрохімічні процеси.

Основні електрохімічні методи:

1) потенціометрія (базується на використанні залежності електрорушійної сили (ЕРС) від концентрації речовини в потенціометричній

комірці, яка містить електроди, що вимірюють електричну напругу між ними;

2) вольтамперометрія, зокрема полярографія та амперометрія (в основі – явище електролізу, отримання в залежності від хімічного складу аналізованої речовини залежності електричний струм – електричний потенціал);

3) кондуктометрія (базується на залежності електропровідності розчинів від хімічної структури розчинених речовин);

4) кулонометрія (в основі – вимір кількості електрики, яка витрачається на окиснення або відновлення досліджуваної речовини при її електролізі (тобто розпаді) за дії постійного електричного струму);

5) електрогравіметрія (базується на вимірі зважуванням кількості продуктів повного електролізу);

6) комбіновані методи.

Лабораторна робота 3.1. Визначення вмісту іонів Купруму потенціометричним методом за допомогою купрум-селективного електроду.

Принцип методу. Потенціометричний метод базується на вимірюванні електрохімічного потенціалу за допомогою іон-селективного електроду. Він складає напівелемент, який містить іон-селективну мембрану (селективну міжфазну межу), внутрішній розчин і внутрішній електрод порівняння або іон-селективну мембрану і твердофазний контакт (твердотільний електрод). Іншим напівелементом в парі з іон-селективним електродом є зовнішній електрод порівняння. Такі електроди дозволяють селективно визначити кількість одних іонів у присутності інших.

Поширеними для іон-селективних електродів є мембрани на основі сульфідів двозарядних металів, які отримують з суміші аргентуму сульфідіду і відповідного

металу. Для визначення іонів Купруму такою потенціометричною системою є, зокрема, $\text{Ag, Ag}_2\text{S} \mid \text{CuS}$.

Для вивільнення зв'язаної міді з матеріалу проби, яка аналізується, ця проба мінералізується.

За використання тест-стандартних розчинів Купруму для визначення величини електрорушійної сили (ЕРС) будують калібрувальний графік, що використовують для визначення вмісту металу в досліджуваній пробі.

Матеріали для дослідження: вода (питна, природна, стічна), водорості, зокрема, ламінарія (морська капуста), тканини риб, ракоподібних або моллюсків.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: іономір з іон-селективним Cu -електродом і електродом порівняння з автоматичною температурною компенсацією показань та корекцією нелінійності електродної характеристики, терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г, шафа сушильна з терморегулятором, гомогенізатор (подрібнювач); хімічно чистий купрум хлорид, дистильована вода, концентрована сульфатна (сірчана) кислота ($\rho=1,84 \text{ г/см}^3$), водний розчин натрію гідроксиду (30%-вий), пергідроль, фенолфталеїн (70%-вий розчин в етиловому спирті); колба К'ельдаля місткістю 500 см^3 , градуйовані пробірки місткістю 5 см^3 , мірні колби місткістю 100 см^3 , крапельниця, хімічні скляні стакани місткістю 10 і 100 см^3 , штатив для пробірок, фільтрувальний папір.

Хід роботи:

Перед початком безпосереднього аналізу експериментальних проб готують ряд градуйованих розчинів. Для цього в мірну колбу місткістю 100 см^3 поміщають наважку купруму хлориду (CuCl_2) з розрахунку, щоби отримати розчин молярної концентрації $0,1 \text{ моль/дм}^3$ купруму хлориду. До наважки додають $50 - 70 \text{ см}^3$ дистильованої води, розчиняють при перемішуванні та доводять об'єм розчину в колбі до мітки (100 см^3) дистильованою водою і ретельно перемішують.

У другу мірну колбу місткістю 100 см^3 додають з першої колби аліквоту 10 см^3 і доводять об'єм в колбі до мітки. В отриманому розчині молярна концентрація $\text{CuCl}_2 - 10^{-2} \text{ моль/дм}^3$. З другої колби переносять 10 см^3 її розчину в третю мірну колбу місткістю 100 см^3 і доводять об'єм в колбі до мітки дистильованою водою. Отримують розчин CuCl_2 молярної концентрації $10^{-3} \text{ моль/дм}^3$. Таким же чином отримують розчини CuCl_2 $10^{-4} \text{ моль/дм}^3$ і $10^{-5} \text{ моль/дм}^3$.

Отримані тест-стандартні розчини поміщають, починаючи з нижнього, в скляні хімічні стакани місткістю 50 см^3 і вимірюють електрорушійну силу (ЕРС) при застосуванні як індикаторний електрод купрум-селективний, а електрод порівняння – хлораргентумний.

За отриманими результатами будують калібрувальний графік, відкладаючи по вісі ординат виміряні значення ЕРС, а абсцис – від'ємні логарифмічні значення молярної концентрації, а саме – $\lg C_{\text{Cu}}$. Цей графік використовують для визначення молярної концентрації Купруму в пробі, яка аналізується.

Для вивільнення зв'язаного Купруму в аналізуємій пробі її мінералізують. Подрібнену пробу тканини масою 2 г (або 2 см^3 досліджуваної рідини, наприклад стічної води) вносять в колбу К'ельдаля місткістю 500 см^3 , додають 10 краплин сульфатної кислоти ($\rho = 1,84 \text{ г/см}^3$). Колбу нагрівають у сушильній шафі до появи білого диму (розкладається сульфатна кислота). Вміст колби набуває чорного кольору. Після охолодження колби до її вмісту додають 20 краплин пергідролу і знову нагрівають до $80 - 90^\circ\text{C}$ до повного знебарвлення вмісту колби. При необхідності в охолоджену колбу вносять додатково пергідроль, якщо при першому його внесенні вміст колби неповністю знебарвився.

Після повної мінералізації сульфатну кислоту нейтралізують розчином натрію гідроксиду (30%-м) за реакцією з фенолфталеїном, три краплини якого (в 70%-му етиловому спирті) додають до мінералізату. Сульфатна

кислота в пробі, яка аналізується, вважається нейтралізованою, якщо індикатор рН фенолфталеїн набуває слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хв (він безбарвний в кислому середовищі та має малиновий колір при рН 8,2 – 10).

В подальшому вміст колби переносять в мірну пробірку і доводять до мітки 5 см³ дистильованою водою. Розчин переносять у скляний хімічний стакан місткістю 10 см³, занурюють у розчин Cu-селективний електрод і електрод порівняння. Електроди приєднують до іоніміру (мілівольтметра) і вимірюють величину ЕРС.

Проведення розрахунків:

За використання калібрувального графіку (див. вище) із залученням отриманого значення ЕРС визначають $\lg C_x$, де C_x – молярна концентрація Cu^{2+} в пробі, яка аналізується, а з цієї величини вже безпосередньо вираховують C_x в одиницях моль $\text{Cu}^{2+}/\text{дм}^3$ гомогенату проби або розчину. За необхідності роблять перерахунки величини C_x в одиниці мкмоль $\text{Cu}^{2+}/100$ г проби (мкмоль $\text{Cu}^{2+}/100$ см³ проби) або мкг $\text{Cu}^{2+}/\text{г}$ проби (мкг $\text{Cu}^{2+}/\text{см}^3$ проби).

Лабораторна робота 3.2. Визначення вмісту небілкового і білкового Нітрогену в комбікормах та сировині методом потенціометричного титрування.

Принцип методу. Небілковий Нітроген входить до складу розчинних у воді речовин, зокрема амідів і азотистих органічних основ, вільних амінокислот тощо. Метод базується на осадженні білків проби, відділені центрифугуванням білку від небілкових речовин і мінералізації отриманих фракцій при випаровуванні і спалюванні з сульфатною кислотою. В цьому випадку Нітроген знаходиться у формі $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Надлишок сульфатної кислоти нейтралізується натрію гідроксидом і NH_4^+ , а потім окиснюється

хлораміном, який у кислому середовищі розкладаються з виділенням хлору. Надлишок хлораміну визначають йодометричним методом: при взаємодії хлораміну з калію йодитом виділяється йод, який відтитровують натрію тіосульфатом. Проводять порівняння витраченого на титрування розчину натрію тіосульфату в контрольній пробі (містить тільки реактиви, а замість проби, яка аналізується, дистильовану воду) з досліджуваною пробою. За проведеними розрахунками проводять визначення вмісту небілкового і білкового Нітрогену в пробі.

Матеріали для дослідження: комбікорма і комбікормова сировина.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: лабораторна центрифуга з швидкістю обертання ротору 6 000 об./хв.; водяна баня; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; дистильована вода; концентрована сульфатна кислота ($\rho = 1,84 \text{ г/см}^3$); купруму сульфат (3%-й); натрію гідроксид молярної концентрації 0,2 моль/дм³; натрію молібдат (10%-й); пергідроль; метиловий оранжевий (1%-й розчин); калію бромід 10 %; фосфатний буфер з рН 6,7; хлорамін молярної концентрації 0,12 моль/дм³; калію йодит (20%-й); щавелева кислота (8%-й); натрію тіосульфат молярної концентрації 0,02 моль/дм³; індикатор на йод – розчин крохмалю (1%-й); фарфорова чашка і ступка з товкачиком; центрифужні пробірки; скляні палички; конічні колби місткістю 100 см³; мірні колби місткістю 50 см³; колба К'ельдаля місткістю 100 см³; скляна кулька для закриття шийки колби К'ельдаля; піпетки місткістю 2 – 10 см³; мірні циліндри місткістю 50 см³.

Хід роботи:

Наважку проби, яка аналізується, масою 2 г розтирають у фарфоровій ступці з 2 см³ дистильованої води. До отриманого гомогенату додають 3 см³ 3%-го розчину купруму сульфату, перемішують і переносять у центрифужну пробірку, при цьому залишок в ступці змивають 8 см³ дистильованої води.

Пробірку вміщують в киплячу водяну баню на 3 хв., періодично перемішуючи вміст пробірки скляною паличкою.

В подальшому вміст пробірки охолоджують до кімнатної температури, додають 3 см³ розчину натрію гідроксиду молярної концентрації 0,2 моль/дм³, ретельно перемішують, дають постояти 10 хв. і центрифугують при швидкості обертання ротора 6 000 об./хв. Надосадкову рідину, яка містить небілковий (водорозчинний) азот, переносять в колбу К'ельдаля місткістю 100 см³, а осад двічі промивають горячою дистильованою водою (70 – 80°C) по 10 см³, додаючи до кожної порції такої води по 1 краплині 3%-го розчину купруму сульфату. Промивні порції дистильованої води переносять у колбу К'ельдаля. Осад в подальшому використовують для визначення білкового Нітрогену.

1. Визначення вмісту небілкового Нітрогену

До об'єднаних екстрактів у колбі К'ельдаля додають 2 см³ концентрованої сульфатної кислоти ($\rho = 1,84 \text{ г/см}^3$), 0,3 см³ розчину 10%-го натрію молібдату (прискорює спалювання проби у присутності калію сульфату, а він, в свою чергу, підвищує температуру кипіння сульфатної кислоти, що теж прискорює процес спалювання проби), 4 краплини пергідролу і випарюють до появи піни, а потім зменшують нагрівання так, щоби піна не потрапила в шийку колби, і продовжують слабке нагрівання до появи білого диму (розкладається сульфатна кислота). Після цього на отвір шийки колби поміщають скляну кульку, збільшують нагрівання і спалюють до повного знебарвлення вмісту колби. Після охолодження до кімнатної температури в колбу додають 10 см³ дистильованої води, перемішують і отриманий розчин переносять у мірну колбу місткістю 50 см³. Колбу К'ельдаля ополіскують дистильованою водою (10 – 20 см³) і її теж вносять в мірну колбу. Об'єм в мірній колбі місткістю 50 см³ доводять до мітки дистильованою водою і перемішують її вміст.

Для визначення вмісту небілкового Нітрогену відбирають 25 см³ отриманого розчину, переносять в конічну колбу місткістю 100 см³ для титрування, додають 1 краплину 1%-го розчину індикатору рН метилового оранжевого і нейтралізують розчином натрію гідроксиду молярної концентрації 0,2 моль/дм³ до переходу забарвлення індикатора в оранжево-жовте.

В подальшому до отриманого розчину додають 10 см³ фосфатного буфера з рН 6,7, що містить 1 см³ 10%-го калію броміду, 5 см³ розчину хлораміну молярної концентрації 0,12 моль/дм³. Колбу накривають фарфоровою чашкою, перемішують круговими рухами і залишають на 25 хв. Після цього додають 2 см³ 20%-го розчину калію йодиду, 10 см³ 8%-го розчину щавлевої кислоти (запобігає окисненню іонами купруму йодит-іона I⁻ до вільного йоду). Йод, що виділився, титрують розчином натрію тіосульфату молярної концентрації 0,02 моль/дм³ до світло – солом'яного забарвлення розчину. Потім додають 1 см³ 1%-го розчину індикатора йоду крохмалю і закінчують титрування при знебарвленні розчину. Фіксують об'єм натрію тіосульфата, який витрачений на титрування.

Один см³ розчину натрію тіосульфату молярної концентрації 0,02 моль/дм³. Витрачений на титрування, відповідає 0,09338 мг Нітрогену.

Для встановлення можливого вмісту азоту в реактивах, які використовуються в даних дослідженнях, проводять контрольні вимірювання з ними за тією ж схемою, що і при визначенні Нітрогену в пробі, замінюючи її об'єм дистильованою водою.

Проведення розрахунків

Відсоткову масову концентрацію небілкового Нітрогену обчислюють за формулою:

$$C = \frac{V_1 \cdot (V_2 - V_3) \cdot T}{V_4 \cdot m} \cdot 100,$$

де C – вміст небілкового Нітрогену в пробі, яка аналізується (%);

V_1 – загальний об'єм розчину, який отриманий після спалювання екстракту, що містить небілковий Нітроген (см^3);

V_2 – об'єм розчину натрію тіосульфату молярної концентрації $0,02 \text{ моль/дм}^3$, який витрачений при титруванні контрольного розчину на вміст у реактивах Нітрогену (см^3);

V_3 – об'єм розчину натрію тіосульфату молярної концентрації $0,02 \text{ моль/дм}^3$, який витрачений на титрування екстракту (розчинної фракції) проби, яка аналізується (см^3);

V_4 – аліквотний об'єм розчину, взятого для визначення Нітрогену хлораміновим методом (см^3);

T – титр розчину натрію тіосульфату молярної концентрації $0,02 \text{ моль/дм}^3$ за Нітрогеном (мг/см^3) ($T = 0,09338 \text{ мг/см}^3$);

m – вага взятої для аналізу проби (г);

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки (%).

2. Визначення вмісту білкового Нітрогену

До осаду, який залишився після відділення центрифугуванням екстракту, що містить небілковий Нітроген, додають 5 см^3 дистильованої води, ретельно перемішують і вносять у колбу К'єльдаля місткістю 100 см^3 , змиваючи залишок невеликими порціями дистильованої води. У колбу додають ще $0,3 \text{ см}^3$ розчину концентрованої сульфатної кислоти ($\rho = 1,84 \text{ г/см}^3$) і випарюють при нагріванні $50 - 60^\circ \text{ C}$ до появи піни. Після охолодження до вмісту колби додають 4 краплини пергідролю, нагрівають до появи піни, недопускаючи потрапляння піни в шийку колби. Як тільки зникне піна і вміст колби закіпає, шийку колби закривають скляною кулькою і спалюють осад до повного знебарвлення вмісту колби. Після охолодження у колбу вносять 10 см^3 дистильованої води. Отриманий розчин переносять у мірну колбу місткістю 50 см^3 , доводять об'єм в колбі до мітки дистильованою водою і перемішують.

З отриманого розчину відбирають 10 см^3 і вносять у колбу для титрування місткістю 100 см^3 , додають 1 краплину індикатора рН (1%-го розчину метилового оранжевого) і нейтралізують розчином натрію гідроксиду молярної концентрації $0,2 \text{ моль/дм}^3$ до переходу коляру забарвлення індикатора в оранжево-жовтий. До

отриманого розчину додають 10 см³ фосфатного буферу з рН 6,7, що містить 1 см³ 10 % -го калію броміду, 5 см³ хлораміну молярної концентрації 0,12 моль/дм³.

В подальшому проводять всі ті ж самі процедури, як і при визначенні вмісту небілкового Нітрогену (див. вище). Колбу накривають фарфоровою чашкою і після перемішування залишають на 25 хв. Потім додають 2 см³ 20%-го розчину калію йодиту, 10 см³ 8%-го розчину щавлевої кислоти і титрують йод, який виділився, натрію тіосульфатом молярної концентрації 0,02 моль/дм³ до світло – солом'яного забарвлення розчину. Потім додають 1 см³ 1%-го розчину індикатора йоду крохмалю і закінчують титрування при знебарвленні розчину. Фіксують об'єм 0,02 моль/дм³ розчини натрію тіосульфата, який витрачений на титрування.

Відсоткову масову концентрацію білкового Нітрогену обчислюють за тією ж формулою, що і небілкового Нітрогену (див. вище).

Лабораторна робота 3.3. Визначення вмісту білку у м'ясі та м'ясних продуктах методом К'ельдаля.

Принцип методу. В основі методу лежить мінералізація проби по К'ельдалю, відгонка аміака з наступним титруванням проби, яка аналізується, сульфатною кислотою.

Матеріали для дослідження: м'ясо; м'ясні продукти.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: апарат для спалювання з регульованою інтенсивністю підігрівання, який дозволяє підігрівати колби К'ельдаля в нахиленому положенні таким чином, щоб зона нагрівання знаходилася нижче рівня рідини в колбі, з витяжним пристроєм, який дозволяє видаляти вапаровання кислот під час обігріву; апарат для перегонки з водяною парою (Парніса – Вагнера) або звичайна установка для перегонки; титратор автоматичний потенціометричний або напівавтоматична бюретка; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею

зважування 200 г; м'ясорубка лабораторна з отворами діаметром не більше 3 мм; мішалка магнітна з регульованим числом обертів і штативом; захоплювач для бюретки місткістю 50 см³; годинник; холодильник побутовий; млин шаровий або ступка фарфорова з товкачиком; дистильована вода; 0,05 моль/дм³ розчин амонію сульфат, 10%-й розчин натрію гідроксиду, 0,65 моль/дм³ розчин борної кислоти, розчин, який вільний від карбонатів (розчиняють 330 г натрію гідроксиду у дистильованій воді і доводять об'єм до 1 дм³); сульфатна кислота молярної концентрації 18,76 моль/дм³ і 0,1 – 0,05 моль/дм³; індикатор Таширо (розчиняють 2 г метилового червоного і 1 г метилового блакитного в 1 дм³ етилового спирту молярної концентрації 16,28 моль/дм³ (96%-ного); розчин зберігають в склянках з темного скла при температурі від 2°C до 8°C); мідний каталізатор (змішують мілкорозтертий безводний калію сульфат та мілко розтертий купрум сульфат у співвідношенні 30:1, суміш зберігають в герметично закритій склянці і попереджують від зволоження); бюретка місткістю 50 см³; циліндри мірні місткістю 25, 50 і 100 см³ або дозатори для рідини тієї ж місткості; колби К'ельдаля місткістю не більше 500 см³; конічна колба або хімічний стакан місткістю 500 см³; крапельниця; засоби для попередження перегрівання під час мінералізації та перегонки: скляне або карборундове намисто, свіжевипалені шматочки фарфору або пемзи; засіб, який попереджає піноутворення під час перегонки: чисте парафінове масло; універсальний паперовий індикатор рН (лакмусовий папір); папір пергаментний розміром 60×80 мм.

Хід роботи:

На пергаментному папері зважують 2 г подрібненої проби, свіже-приготовленої або розмороженої, яка зберігалася при температурі не більше 4° С 24 год. Для проб з великим вмістом жиру, маса наважки не повинна переважати 1,5 г.

Наважку проби на пергаментному папері поміщають в колбу К'ельдаля з декількома скляними або карборундовими намистинками чи шматочками

фарфору (попереджують перегрівання розчину в колбі), а також 15,5 г мідного каталізатора і 25 см³ сульфатної кислоти молярної концентрації 18,76 моль/дм³. Вміст колби обережно перемішують і колбу закріплюють під кутом біля 40° відносно вертикалі на апараті для спалювання. Вміст колби обережно нагрівають до появи піни і повного розчинення її вмісту.

Потім нагрів посилюють і, періодично обертаючи колбу навколо вісі, витримують в стані кипіння до повного освітлення ще 90 хв. Загальний термін мінералізації повинен бути не менше 2 год. Вміст колби охолоджують приблизно до 40° С і обережно додають 50 см³ дистильованої води, перемішують і охолоджують до кімнатної температури.

В подальшому вміст колби К'ельдаля піддають перегонці з водяною парою або простій перегонці, для чого монтують відповідну установку. Як приймач використовують конічну колбу місткістю 500 см³, а при використанні титратора скляний хімічний стакан місткістю 500 см³, в які додають 50 см³ 0,65 моль/дм³ розчину борної кислоти і 4 краплини індикатору Таширо. Колбу або хімічний стакан поміщають під холодильник установки для перегонки таким чином, щоби нижній кінець холодильника цієї установки був повністю занурений у рідину.

Для перегонки з водяною парою вміст колби К'ельдаля переносять в колбу для перегонки, ополіскуючи колбу К'ельдаля 50 см³ дистильованої води. Потім додають 3 краплини парафінового масла з метою зменшення піноутворення, обережно додають 100 см³ 10%-го розчину натрію гідроксиду таким чином, щоби в колбі утворилося два шари рідини. Апарат для перегонки з водяною парою герметизують і пропускають водяну пару крізь вміст колби для перегонки. З моменту кипіння вміст колби продовжують нагрівати протягом 20 хв. Закінчують перегонку після отримання не менше 150 см³ дистилату.

При простій перегонці вміст колби К'ельдаля обережно розбавляють 300 см³ дистильованої води, перемішують і охолоджують до кімнатної

температури, додають декілька карборундових намистинок або шматочків фарфору чи пемзи і 3 краплини парафінового масла. Потім додають 100 см³ 10%-го розчину натрію гідроксиду таким чином, щоби він утворював окремий шар на дні колби К'ельдаля. Одразу колбу підключають до апарату для перегонки. Перегонку закінчують після отримання не менше 150 см³ дистиляту.

Після збору не менше 150 см³ дистиляту, який отримується після перегонки, конічну колбу або хімічний стакан (приймник) опускають таким чином, щоби нижній кінець холодильника знаходився на рівні дистиляту, ополоскують кінець холодильника дистильованою водою і після перемішування на магнітній мішалці перевіряють універсальним індикатором рН (лакмусовим папером) забарвлення конденсату, який стікає з холодильника. Перегонку закінчують при відсутності зміни забарвлення.

Вміст конічної колби або хімічного стакану (приймника) титрують розчином сульфатної кислоти (0,1 моль/дм³ – 0,05 моль/дм³) з використанням бюретки і відмічають кількість кислоти, яка використана на титрування.

У контрольній пробі замість наважки м'яса або м'ясного продукту беруть шматок пергаментного паперу і проводять з ним всі ті самі процедури, що і з наважкою проби.

З метою перевірки установки, яка використовується для перегонки, до неї поміщають 10 см³ 0,05 моль/дм³ розчину амонію сільфату, підлужують до рН приблизно 8,0 10 %-м розчином КОН, переганяють і титрують (див. вище). Низький результат (менше $0,95 \cdot 10^{-3}$ моль) може свідчити про неповну перегонку або нещільність установки для перегонки.

З кожної проби проводять не менше 3-х паралельних визначень і обчислюють середню арифметичну величину результатів титрування, яку використовують для обчислення вмісту загального Нітрогену з наступним перерахунком на білок.

Проведення розрахунків:

Вміст загального Нітрогену (у відсотках, %) обчислюють за формулою:

$$C_A = \frac{0,14 \cdot (V_1 - V_2)}{m},$$

де C_A – вміст загального Нітрогену в пробі, яка аналізується (%);

V_1 – точний об'єм 0,1 моль/дм³ – 0,05 моль/дм³ сульфатної кислоти, який використаний на титрування проби, що аналізується (см³);

V_2 – точний об'єм 0,1 моль/дм³ – 0,05 моль/дм³ сульфатної кислоти, який використаний на титрування контрольної проби (см³);

m – маса проби, яка аналізується (г);

0,14 – коефіцієнт перерахунку згідно методики.

Вміст загального білку (у відсотках, %) обчислюють за формулою:

$$C_B = 6,25 \cdot C_A,$$

де C_B – вміст загального білку в пробі, яка аналізується (%);

C_A – вміст загального Нітрогену в пробі, яка аналізується (%);

6,25 – коефіцієнт перерахунку загального Нітрогену на загальний білок.

Лабораторна робота 3.4. Визначення окиснюваності м'яса і м'ясних продуктів біхроматним методом.

Принцип методу. Окиснення (оксидация) – хімічний процес приєднання речовиною кисню, внаслідок чого ця речовина втрачає електрони або відщеплює водень. Окиснюваністю називається кількість кисню у мг, яка необхідна для окиснення певної кількості (об'єму) речовини.

В залежності від використаного окисника застосовуються, в основному, наступні методи визначення окиснюваності: перманганатний, біхроматний, церієвий, іодатний і хлорний. Ступінь окиснення органічних речовин залежить від багатьох чинників, основні з яких – властивості окисника і його концентрація, температура і рН середовища тощо. Найбільш повне

окиснення органічних речовин досягається біхроматним методом, який запропонований для визначення органічних речовин при досліджуванні води.

Метод базується на тому, що калію біхромат у розчині сульфатної кислоти діє як сильний окисник. Надлишок калію біхромату відтитровують сіллю Мора в присутності індикатора фероїну.

Матеріали для дослідження: м'ясо, м'ясопродукти.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: піщана баня; електроплитка побутова піщана база; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; центрифуга лабораторна з швидкістю обертання ротора 6 000 об./хв.; гомогенізатор; годинник; мішалка; хімічний термометр з межею виміру температури 0 – 100 °C і ціною поділки 0,1 °C; крапельниця; дистильована вода; концентрована сульфатна кислота ($\rho = 1,84 \text{ г/см}^3$); кристалічний купрум сульфат; індикатор фероїн (70%-й розчин); калію біхромат молярної концентрації 0,01 моль/дм³ (титр-стандарт); сіль Мора (амоній феруму (II) сульфат гексагідрату, $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ молярної концентрації 0,01 моль/дм³); хімічні скляні стакани місткістю 50 і 100 см³; круглодонна колба з оберненим холодильником місткістю 100 см³; конічна колба місткістю 500 см³; скляні палички; бюретка місткістю 50 см³; свіжевипалені дрібні шматочки пемзи, які додаються в колбу для попередження перегріву; циліндр мірний місткістю 50 см³; бюретка місткістю 50 см³.

Хід роботи

До скляного хімічного стакану місткістю 100 см³ вносять наважку мілкоподрібненої проби (м'яса або м'ясопродукта) масою 10 г, наливають 50 см³ підігрітої до 60° C дистильованої води, витримують 30 хв при регулярному перемішуванні скляною паличкою. Над осадом утворюється водна витяжка з м'яса або м'ясопродукту, яку відділяють від осаду центрифугуванням при швидкості обертання ротора центрифуги 6 000 об./хв.

В круглодонну колбу місткістю 100 см³ поміщають 50 см³ водної витяжки (надосадової рідини після центрифугування), додають 25 см³ калію біхромату молярної концентрації 0,01 моль/дм³ і обережно малими порціями 75 см³ концентрованої сульфатної кислоти, суміш старанно перемішують після додавання кожної порції цієї кислоти. Потім додають 0,4 г купруму сульфату і декілька шматочків свіжевивпаленої пемзи, які будуть запобігати перегріванню рідини в колбі.

Колбу з сумішю під'єднують до оберненого холодильника, нагрівають на пісчаній бані до рівномірного слабкого кипіння і кип'ятять протягом 2 год.

Після закінчення нагрівання вміст круглодонної колби переносять у конічну колбу місткістю 500 см³, а стінки як самої круглодонної колби, так і оберненого холодильника змивають 200 см³ дистильованої води (загальний об'єм суміші в конічній колбі – 350 см³). До вмісту цієї колби додають 4 краплини 70 %-го розчину фероїну в 96 %-му етиловому спирті і ретельно перемішують. Потім колбу ставлять на магнітну мішалку і при безперервному перемішуванні титрують надлишок калію біхромату розчином солі Мора молярної концентрації 0,01 моль/дм³. Фіксують об'єм солі Мора, який витрачений на титрування.

Для виявлення в пробі можливих неорганічних відновників або вони присутні у реактивах, як домішки, проводять дослідження контрольної проби, з якою проводять всі ті ж процедури, що і з експериментальною пробою, але замість 50 см³ водної витяжки додають 50 см³ дистильованої води. Після закінчення титрування фіксують об'єм солі Мора, який витрачений на титрування контрольної проби.

Проведення розрахунків

Окиснюваність проби, яка аналізується, визначають за показником, який має назву хімічне поглинання кисню (ХПК). Його обчислюють за формулою:

$$ХПК = \frac{(V_1 - V_2) \cdot N \cdot 8 \cdot 1000}{V},$$

де *ХПК* – хімічне поглинання кисню (мг О₂/дм³);

V – об'єм витяжки, яка аналізується (см³);

*V*₁ і *V*₂ – об'єми розчину солі Мора, які витрачені на титрування контрольної проби і тієї, яка аналізується, відповідно (см³);

N – молярна концентрація еквівалентів титрованого (0,01 моль/дм³) розчину солі Мора;

8 – число міліграмів кисню, яке еквівалентне 1 см³ 0,01 моль/дм³ розчину солі Мора;

1000 – коефіцієнт перерахунку дм³ у см³.

Лабораторна робота 3.5. Визначення кислотності молока та молочних продуктів методом потенціометричного титрування.

Принцип методу. Метод базується на нейтралізації кислот, які містяться в пробі молока або молочних продуктах, розчином натрію гідроксиду до заздалегідь заданого значення рН 8,9 (точки еквівалентності) за допомогою автоматичного титрування та індикації точки еквівалентності за допомогою потенціометричного аналізатора.

Матеріал для дослідження: молоко, молоко з наповнювачами (шоколадне, кавове), вершки, кисле і ацидофільне молоко, кефір, кумис та інші кисломолочні продукти; сметана; морозиво; сир і сирні вироби.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: аналізатор потенціометричний (титратор) з діапазоном виміру рН 4 – 10 і ціною поділки шкали не більше 0,05 рН; блок автоматичного титрування, який сумісний з потенціометричним аналізатором і має дозатор розчину (бюретку) місткістю не менше 5 см³ з ціною поділки шкали не більше 0,05 см³; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межею зважування 200 г; магнітна мішалка; вода дистильована; натрію гідроксид (стандарт-титр) розчин молярної концентрації 0,1 моль/дм³; скляні хімічні стакани

місткістю 50 і 100 см³; колби конічні місткістю 1 дм³; піпетки місткістю 10 і 20 см³; циліндри мірні місткістю 50 см³; скляні палички.

Хід роботи

Підключають блок автоматичного титрування до потенціометричного аналізатора згідно «Інструкції по експлуатації», а ці прилади підключають до електромережі.

Заповнюють дозатор блоку автоматичного титрування розчином натрію гідроксиду молярної концентрації 0,1 моль/дм³, налаштовують потенціометричний аналізатор на діапазон вимірювання рН, який включає в себе рН 8,9, а на блоці рН 4,0, з якого подача натрію гідроксиду повинна вестись краплинами. Встановлюють також час витримки після закінчення титрування – 30 с.

1. Проведення аналізу молока, молока з наповнювачами (шоколадне, кавове), вершків, кислого молока, ацидофільного молока, кефіру, кумису та інших кисломолочних продуктів.

В скляний хімічний стакан місткістю 50 см³ поміщають 20 см³ дистильованої води і 10 см³ проби, яка аналізується. Суміш перемішують.

Стакан з отриманою сумішшю ставлять на магнітну мішалку, яку вмикають. В цю суміш вставляють електроди потенціометричного аналізатора і зливну трубку дозатора блоку автоматичного титрування.

При включенні блоку автоматичного титрування розчин натрію гідроксиду починає поступати з дозатора блоку в стакан з пробой, яка аналізується, при цьому ця проба нейтралізується. При досягненні точки еквівалентності (рН 8,9) і закінченні часу витримки (30 с) процес нейтралізації автоматично припиняється. Проводять відлік кількості розчину натрію гідроксиду молярної концентрації 0,1 моль/дм³, яка витрачена на нейтралізацію проби.

2.Проведення аналізу морозива і сметани

В скляному хімічному стакані місткістю 50 см³ зважують 5 г проби, яка аналізується. Поступово при постійному перемішуванні скляною паличкою до проби морозива або сметани додають 30 см³ дистильованої води. Виміри проводять таким же чином, як молока і кисломолочних продуктів (див. вище).

3.Проведення аналізу сиру і сирних виробів

У фарфорову ступку поміщають наважку сиру або сирного продукту масою 5 г. Пробу ретельно перемішують і розтирають товчачиком. Потім вміст ступки переносять в скляний хімічний стакан місткістю 100 см³, при цьому його змивають невеликими порціями дистильованої води, яка підігріта до 35 – 40° С. Загальний об'єм дистильованої води повинен бути 50 см³. суміш ретельно перемішують і проводять виміри таким же чином, як молока і кисломолочних продуктів (див. вище).

Проведення розрахунків

Кислотність молока і молочних продуктів визначають в градусах Тернера (°Т) – об'ємі (см³) водного розчину натрію гідроксиду молярної концентрації 0,1 моль/дм³, який необхідний для нейтралізації 100 см³ (100 г) продукту, що аналізується. Числове значення цього об'єму (градусу Тернера) множать на коефіцієнт перерахунку, який має певне значення для кожного продукту:

10 – для молока, молока з наповнювачами, вершків, кислого молока, ацидофільного і кефіру, кумису та інших кисломолочних продуктів (100см³:10см³=10);

20 – для морозива, сметани, сиру і сирних виробів (100г:10г=20).

Кислотність молока або молочного продукту обчислюється за формулою:

$$K = k \cdot V,$$

де K – кислотність молока або молочного продукту (°Т);

k – коефіцієнт перерахунку об'єму (маси) продукту, який взятий для аналізу на 100 см³ (100 г), а саме для молока і кисломолочних продуктів – 10, а морозива, сметани, сиру і сирних виробів – 20.

V – об'єм натрію гідроксиду молярної концентрації 0,1 моль/дм³, який затрачений на нейтралізацію проби, що аналізується (см³).

Лабораторна робота 3.6. Визначення кислотності молока та молочних продуктів методом титрування з використанням індикатору фенолфталеїну

Принцип методу. В основі методу покладено нейтралізацію кислот молока і молочних продуктів розчином натрію гідроксиду в присутності кислотно – лужного індикатору рН фенолфталеїну (у кислому середовищі стає безбарвним, а в лужному (рН 8,2 – 10,0) – набуває малинового кольору).

Матеріал для дослідження: молоко, молоко з наповнювачами (шоколадне, кавове), вершки, кисле і ацидофільне молоко, кефір, кумис та інші кисломолочні продукти; сметана; морозиво; сир і сирні вироби; вершкове масло, його жирна фаза і плазма.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: скляні жирометри; шафа сушильна з терморегулятором, який дозволяє підтримувати температуру $(50 \pm 5) ^\circ\text{C}$; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межою зважування 200 г; центрифуга лабораторна з швидкістю обертання ротора не менше 1 000 об./хв.; водяна баня; хімічний термометр ртутний скляний з діапазоном виміру 0 – 100° С і ціною поділки 0,1° С; вода дистильована; натрію гідроксид, стандарт-титр, розчин молярної концентрації 0,1 моль/дм³; кобальту сульфат, розчин масової концентрації 25 г/дм³; етер діетиловий; спирт етиловий; фенолфталеїн (розчин в 70 %-му етиловому спирті масової концентрації фенолфталеїну 10 г/дм³); колби конічні місткістю 50, 100 і 250 см³; скляні хімічні стакани місткістю 100 і 250 см³; лійки; піпетки місткістю 1, 2, 5, 10 і 20 см³; циліндр мірний місткістю

100 см³; бюретки місткістю 10 см³; палички скляні; крапельниця; ступка фарфорова з товкачиком; корки для жирометрів; універсальний лакмусовий папір для визначення рН; папір фільтрувальний «синя стрічка».

Хід роботи

1. Приготування контрольних еталонів забарвлення для молока і вершків

В колбу місткістю 100 см³ або 250 см³ додають молоко в об'ємі 10 см³ і дистильовану воду в об'ємі 20 см³; молоко з наповнювачами (шоколадне, кавове) – в об'ємі 10 см³ і дистильовану воду в об'ємі 40 см³; вершки – в об'ємі 10 см³ і дистильовану воду в об'ємі 20 см³, а також в кожену колбу 1 см³ розчину кобальт сульфату масової концентрації 25 г/дм³. Суміш ретельно перемішують скляною паличкою.

Термін зберігання цього еталона при кімнатній температурі – не більше 8 год.

2. Приготування контрольних еталонів забарвлення суміші етилового спирту і диетилового етеру для аналізу молока, молока з наповнювачами, вершків, кислого і ацидофільного молока, кефіру, кумису та інших кисломолочних продуктів

В колбу місткістю 50 см³ додають по 10 см³ етилового спирту і диетилового етеру, а також 1 см³ розчину кобальта сульфатнокислого масової концентрації 25 г/дм³. Суміш ретельно перемішують скляною паличкою.

Термін зберігання цих еталонів при кімнатній температурі – не більше 1 доби.

3. Приготування жирової фази вершкового масла

В сухий скляний хімічний стакан місткістю 250 см³ додають 150 г вершкового масла. Стакан поміщають у водяну баню або сушильну шафу при температурі 50 (±5) °С і витримують до повного розчинення і розділення

масла на жир і плазму. Зі стакану обережно зливають верхній шар жиру і його фільтрують через паперовий фільтр в колбу місткістю 250 см³.

Готують жирову фазу вершкового масла безпосередньо перед вимірюванням.

4. Приготування плазми вершкового масла

Плазму вершкового масла, яка залишилась після відділення жирової фази, переносять в жирометр, який щільно закривають корком, поміщають в центрифугу і центрифугують 5 хв при швидкості обертання ротору 1 000 об/хв. Потім жирометр поміщають в стакан з холодною водою і витримують до застигання молочного жиру, який відділився від плазми в процесі центрифугування. Вільну від жиру плазму обережно наливають в сухий стакан місткістю 100 см³ і ретельно перемішують скляною паличкою.

Готують плазму вершкового масла безпосередньо перед вимірюванням.

5. Приготування суміші етилового спирту і диетилового етеру для аналізу вершкового масла або його жирової фази

В колбу місткістю 50 см³ додають по 10 см³ етилового спирту і диетилового етеру, 3 краплі фенолфталеїну (розчину в 70 %-му етиловому спирті масової концентрації 10 г/дм³) і нейтралізують суміш розчином натрію гідроксиду (0,1 моль/дм³) до появи слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хв.

Суміш готують безпосередньо перед вимірюванням кислотності вершкового масла або його жирової фази.

6. Приготуванні контрольних еталонів забарвлення для вершкового масла і його жирової фази

В скляний хімічний стакан місткістю 50 см³ додають 5 г розтопленого вершкового масла (див. вище), 20 см³ нейтралізованої розчином натрію гідроксиду (0,1 моль/дм³) суміші етилового спирту і диетилового етеру (див. вище), а також 1 см³ розчину кобальт сульфату (25 г/дм³). Суміш ретельно перемішують скляною паличкою.

Термін зберігання цих еталонів при кімнатній температурі – не більше 1 доби.

7. Приготуванні контрольних еталонів забарвлення для плазми вершкового масла

В колбу місткістю 100 см³ додають 10 см³ плазми вершкового масла (див. вище) і 20 см³ дистильованої води, отриманою сумішшю 3 – 4 рази промивають піпетку, якою набирали плазму вершкового масла. Суміш ретельно перемішують скляною паличкою.

Термін зберігання цих еталонів при кімнатній температурі – не більше 1 доби.

Безпосередньо аналіз молока і молочних продуктів проводять з певними відмінностями.

8. Аналіз молока, молока з наповнювачами, вершків, кислого і ацидофільного молока, кефіру, кумису та інших кисломолочних продуктів

В колбу місткістю 250 см³ додають по 10 см³ досліджуваного продукту, у випадку молока, вершків, кислого і ацидофільного молока, кефіру, кумису та інших кисломолочних продуктів – ще по 20 см³ дистильованої води, а у випадку молока з наповнювачами (шоколадне, кавове) – 40 см³ дистильованої води. Додатково в колбу вносять по 3 краплини розчину фенолфталеїну (розчину в 70 %-му етиловому спирті масової концентрації 10 г/дм³). При аналізі вершків і кисломолочних продуктів залишки продукту переносять з піпетки в колбу шляхом промивання піпетки отриманою сумішшю 3 – 4 рази.

Суміш ретельно перемішують скляною паличкою. В подальшому її титрують розчином натрію гідроксиду (0,1 моль/дм³) до появи слабо-рожевого забарвлення для молока і вершків, що не зникає протягом 1 хв, і яке відповідає контрольному еталону забарвлення (див. вище). Фіксують

об'єм $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчину натрію гідроксиду, який витрачений на титрування.

Для молока з наповнювачами (шоколадне, кавове) для точного встановлення кінця титрування візуальним методом поряд з пробюю, яка титрується, поміщають контрольний еталон (див. вище), який містить 10 см^3 проби такого молока і 40 см^3 дистильованої води. Фіксують об'єм $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчину натрію гідроксиду, який витрачений на титрування проби в момент зміни забарвлення відносно контрольного еталону.

9. Аналіз морозива і сметани

При аналізі незабарвленого морозива, а також сметани в колбу місткістю 250 см^3 поміщають 5 г продукту, 30 см^3 дистильованої води і 3 краплини фенолфталеїну (розчину в 70 %-му етиловому спирті масової концентрації 10 г/дм^3). Суміш ретельно перемішують скляною паличкою і титрують розчином натрію гідроксиду ($0,1 \text{ моль/дм}^3$) до появи слабо – рожевого забарвлення, що не зникає протягом 1 хв. Фіксують об'єм натрію гідроксиду, який витрачений на титрування.

Для забарвленого морозива наважку 5 г поміщають в колбу місткістю 250 см^3 , куди додають 80 см^3 дистильованої води і 3 краплини фенолфталеїну (розчину в 70 %-му етиловому спирті масової концентрації 10 г/дм^3). Суміш ретельно перемішують скляною паличкою і титрують ($0,1 \text{ моль/дм}^3$) розчином натрію гідроксиду до появи слабо–рожевого забарвлення для молока і вершків, що не зникає протягом 1 хв. Фіксують об'єм $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчину натрію гідроксиду, який витрачений на титрування.

Для визначення закінчення титрування візуальним методом забарвленого морозива колбу з сумішшю поміщають на білий листок паперу, а поруч з нею – колбу з 5 г даного морозива і 80 см^3 дистильованої води, вміст колби ретельно перемішують (контрольний еталон). Фіксують об'єм $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчину натрію гідроксиду, який витрачений на титрування проби в момент зміни забарвлення відносно контрольного еталону.

10. Аналіз сиру і сирних виробів

У фарфорову ступку поміщують 5 г продукту, розтирають товкачиком і ретельно перемішують. Потім додають невеликими порціями при постійному перемішуванні скляною паличкою 50 см³ дистильованої води, яка нагріта до температури 35 – 40° С, а також 3 краплини фенолфталеїну (розчину в 70 %-му етиловому спирті масової концентрації 10 г/дм³). Суміш ретельно перемішують скляною паличкою і титрують (0,1 моль/дм³ розчином натрію гідроксиду) до появи слабко – рожевого забарвлення для молока і вершків, що не зникає протягом 1 хв. Фіксують об'єм 0,1 моль/дм³ розчину натрію гідроксиду, який витрачений на титрування.

11. Аналіз вершкового масла

В колбу місткістю 100 см³ поміщують 5 г вершкового масла, нагрівають колбу на водяній бані або у сушильній шафі до температури 50 ± 5° С до розтоплення масла, а потім додають 20 см³ нейтралізованої суміші етилового спирту і диетилового етеру (див. вище), 3 краплини фенолфталеїну (розчину в 70 %-му етиловому спирті масової концентрації 10 г/дм³) і титрують (0,1 моль/дм³) розчином натрію гідроксиду при постійному перемішуванні скляною паличкою до появи слабко – рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хв і відповідає забарвленню відповідної контрольної проби еталону (див. вище). Фіксують об'єм 0,1 моль/дм³ розчину натрію гідроксиду, який витрачений на титрування.

12. Аналіз жирової фракції вершкового масла

В колбу місткістю 100 см³ додають 5 г жирової фракції вершкового масла, а потім проводять аналіз як для вершкового масла (див. вище). Фіксують об'єм 0,1 моль/дм³ розчину натрію гідроксиду, який витрачений на титрування.

13. Аналіз плазми вершкового масла

В колбу місткістю 100 см³ додають 10 см³ плазми вершкового масла (див. вище), 20 см³ дистильованої води. Отриманою сумішшю 3 – 4 рази

промивають піпетку, потім додають 3 краплини фенолфталеїну (розчину в 70 %-му етиловому спирті масової концентрації 10 г/дм³) і ретельно перемішують скляною паличкою. Отриману суміш титрують при постійному перемішуванні розчином (0,1 моль/дм³) натрію гідроксиду до появи слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хв і відповідає забарвленню відповідного контрольного еталону (див. вище). Фіксують об'єм (0,1 моль/дм³ розчину) натрію гідроксиду, який витрачений на титрування.

Проведення розрахунків

Кислотність молока, молока з наповнювачами, вершків, кислого і ацидофільного молока, кефіру, кумису та інших кисломолочних продуктів, а також морозива, сметани, сиру і сирних продуктів, плазми вершкового масла визначають в градусах Тернера (°Т) – об'ємі (см³) водного розчину натрію гідроксиду молярної концентрації 0,1 моль/дм³, який необхідний для нейтралізації 100 см³ (100 г) продукту, який аналізується. При нейтралізації 10 см³ молока, молока з наповнювачами, вершків, кислого і ацидофільного молока, кефіру, кумису та інших кисломолочних продуктів коефіцієнт перерахунку на градуси Тернера дорівнює 10 (100 см³ : 10 см³ = 10), а морозива, сметани, сиру і сирних виробів 20 (100 г : 5 г = 20).

Кислотність молока і молочних продуктів обчислюється за формулою:

$$K_M = k \cdot V_I,$$

де K_M – кислотність молока або молочного продукту (°Т);

k – коефіцієнт перерахунку об'єму (маси) продукту, який взятий для аналізу на 100 см³ (100 г), а саме для молока і кисломолочних продуктів – 10, а морозива, сметани, сиру і сирних виробів – 20;

V_I – об'єм натрію гідроксиду молярної концентрації 0,1 моль/дм³, який затрачений на нейтралізацію 10 см³ молока і кисломолочних продуктів або 5 г морозива, сметани, сиру і сирних виробів.

Кислотність вершкового масла та його жирової фази визначають в градусах Кеттстофера ($^{\circ}\text{K}$) – об'ємі (см^3) водного розчину натрію гідроксиду молярної концентрації $0,1 \text{ моль/дм}^3$, який необхідний для нейтралізації 5 г вершкового масла або його жирової фази, помножений на 2 .

Таким чином, кислотність вершкового масла та його жирової фази обчислюється за формулою:

$$K_{\text{В.М.}} = 2V,$$

де $K_{\text{В.М.}}$ – кислотність вершкового масла або його жирової фази ($^{\circ}\text{K}$);

V – об'єм натрію гідроксиду молярної концентрації $0,1 \text{ моль/дм}^3$, який необхідний для нейтралізації 5 г вершкового масла або жирової фази;

2 – коефіцієнт перерахунку.

Лабораторна робота 3.7. Визначення пероксидного числа тваринних жирів та рослинних олій.

Принцип методу. Пероксидне число – відношення кількості речовин у пробі, яка аналізується, в перерахунку на активний кисень, які за стандартних умов окиснюють калію йодит, до маси дослідної проби. Його виражають у мілімолях активного кисню на кілограм проби. В деяких випадках пероксидне число виражають у міліеквівалентах активного кисню на кілограм проби.

Метод ґрунтується на обробленні проби, яка аналізується, і що розчинена в суміші оцтової кислоти та ізооктану, розчином калію йодиду. Йод, який виділився, титрують розчином натрію тіосульфату і порівнюють результати титрування дослідної та контрольної проб.

Матеріал для дослідження: тваринні жири і рослинні олії.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: титратор (за можливості автоматичний); терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межою зважування 200 г ; гомогенізатор; побутовий холодильник; магнітна мішалка; електроплитка; дистильована вода; льодяна

оцтова кислота, яка звільнена від кисню продуванням сухого і чистого інертного газу (азоту або іншого газу); ізооктан, який звільнений від кисню продуванням сухого і чистого інертного газу (азоту або вуглекислого газу); насичений розчин калію йодиду; саліцилова кислота кристалічна; розчин натрію тіосульфату молярної концентрації 0,01 і 0,002 моль/дм³; розчин крохмалю масової концентрації 5 г/дм³; мірні колби місткістю 100 см³ і 1 дм³; конічні колби з притертим корком місткістю 100 см³; бюретки; піпетки мірні місткістю 1, 2, 5, 10 і 20 см³; скляні палички; циліндри мірні місткістю 50 см³.

Хід роботи

При відборі проб, які аналізуються, тверді жири не розтоплюють, а беруть пробу з середньої частини і слідкують, щоб у пробу не потрапив поверхневий шар. Після гомогенізації пробу одразу поміщають в конічну колбу місткістю 100 см³ і щільно закривають корком. Напівтверді проби відбирають з середньої частини і гомогенізують, а проби рідких олій відбирають піпеткою з середнього шару рідини; відібрані проби також поміщають у конічні колби з притертим корком.

Величина наважки проби, яка аналізується, залежить від очікуваного значення пероксидного числа (табл. 3.1). Якщо його неможливо оцінити, то перше попереднє визначення роблять з навакою масою від 1,2 г до 2,0 г.

Таблиця 3.1 – Маса наважки проби тваринних жирів та рослинних олій при визначенні пероксидного числа

Передбачуване пероксидне число, ммоль/кг	Маса наважки, г
0 – 6	5,0 – 2,0
6 – 10	2,0 – 1,2
10 – 15	1,2 – 0,8
15 – 25	0,8 – 0,5
25 – 45	0,5 – 0,3

Перед початком роботи необхідно приготувати ряд розчинів.

1. Суміш оцтової кислоти з ізооктаном

В колбі змішують 3 об'єми льодяної оцтової кислоти і 2 об'єми ізооктану, ретельно перемішують.

Термін зберігання розчину – до 1 доби.

2. Розчин калію йодиду насичений

У дистильованій воді розчиняють калію йодид. Про насиченість калію йодиду свідчить наявність нерозчинних кристалів у воді.

Розчин повинен бути свіжеприготованим.

3. Розчин натрію тіосульфату ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) молярної концентрації 0,1 моль/дм³

В мірній колбі місткістю 1 дм³ розчиняють 24,9 г натрію тіосульфату пентагідрату ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) у дистильованій воді і доводять до мітки.

Розчини натрію тіосульфату молярної концентрації 0,01 і 0,002 моль/дм³ готують розведенням розчину молярної концентрації 0,1 моль/дм³.

Термін зберігання розчину – до 1 місяця.

4. Розчин крохмалю масової концентрації 5 г/дм³

Змішують 1 г крохмалю з невеликою кількістю холодної (10 – 15° С) дистильованої води. Перемішують скляною паличкою, вливають в цю суміш 200 см³ киплячої дистильованої води. Додають 250 мг саліцилової кислоти як консерванта, кип'ятять протягом 3 хв. Після цього розчин швидко охолоджують.

Термін зберігання розчину – до 3-х тижнів.

В подальшому в конічну колбу місткістю 100 см³ додають 50 см³ суміші оцтової кислоти з ізооктаном (див. вище) і закривають корком. Розчин помішують круговими рухами колби до повного розчинення наважки проби. Піпеткою додають 0,5 см³ насиченого розчину калію йодиду і дають суміші в закритій корком колбі простояти 1 хв, періодично (не менше 3-х разів) енергійно струшуючи. Потім відразу наливають 30 см³ дистильованої води.

Вміст колби титрують розчином натрію тіосульфату молярної концентрації $0,01 \text{ моль/дм}^3$ і постійно перемішують доти, поки жовтий колір йоду майже зникне. Потім додають $0,5 \text{ см}^3$ розчину крохмалю масової концентрації 5 г/дм^3 і продовжують титрувати при постійному перемішуванні до зникнення синього забарвлення. В кінці досліду титрант (натрію тіосульфат) необхідно додавати краплинами.

Якщо на титрування витрачено менше ніж $0,5 \text{ см}^3$ розчину натрію тіосульфату молярної концентрації $0,01 \text{ моль/дм}^3$, то повторюють аналіз з розчином натрію тіосульфату молярної концентрації $0,002 \text{ моль/дм}^3$ з ретельним перемішуванням.

Паралельно аналізу експериментальної проби проводять такі ж дослідження з контрольними пробами.

Проведення розрахунків

Пероксидне число обчислюють в одиницях у мілімолях активного кисню на кілограм проби за формулою:

$$\text{ПЧ} = \frac{(V - V_0) \cdot 1000}{2m} \cdot C,$$

де ПЧ – пероксидне число в одиницях мкмоль активного кисню на кілограм маси проби;

V – об'єм розчину натрію тіосульфату, який витрачений на титрування проби, що аналізується (см^3);

V_0 – об'єм розчину натрію тіосульфату, який витрачений на титрування контрольної проби (см^3);

C – молярна концентрація розчину натрію тіосульфату, яка використана для титрування (моль/дм^3);

m – маса проби, яка аналізується (г);

1000 – коефіцієнт перерахунку грамів у кілограми.

Лабораторна робота 3.8. Визначення кислотного числа рослинних олій.

Принцип методу. Кислотне число (кислотність жиру) – кількість міліграм розчину лугу (KOH або NaOH) молярної концентрації 0,1 моль/дм³, яка потрібна для нейтралізації вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру. Це один з показників якості жирових продуктів, зокрема олій, який вказує на вміст у них вільних жирних кислот.

Метод ґрунтується на розчиненні визначеної маси олії у суміші розчинників з подальшим титруванням вільних жирних кислот водним або спиртовим розчином калію (або натрію) гідроксиду.

Для визначення точної концентрації лужного титранту одночасно титрують наважку стандартної вільної кислоти (бензойної або стеаринової) тим методом, яким виконують визначення кислотного числа олій.

Матеріал для дослідження: рослинні олії.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: титратор (за можливості автоматичний); ваги аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межою зважування 200 г; магнітна мішалка; побутовий холодильник; рН-метр (іономір); хімічний термометр ртутний скляний з діапазоном виміру 0–100⁰С і ціною поділки 0,1⁰С; годинник; сушильна шафа; дистильована вода; калію гідроксид (KOH) або натрію гідроксид (NaOH) водний чи спиртовий розчини молярної концентрації 0,1 моль/дм³ і 0,5 моль/дм³; спирт етиловий або ізопропиловий; етер диетиловий; хлороформ; толуол; бензойна або стеаринова кислоти; індикатор рН фенолфталеїн (розчин в 70 %-му етиловому спирті масової концентрації 10 г/дм³); суміш розчинників спиртово – етерна (від 1:1 до 1:4) або спиртово – хлороформна (1:1), або спиртово – толуольна (1:1); конічні колби місткістю 100 і 250 см³; бюретки місткістю 5, 10 і 25 см³; лійки; мірні колби місткістю 100 і 1000 см³;

скляні стакани місткістю 50 і 100 см³; мірні циліндри місткістю 50 см³; піпетки мірні місткістю 1 – 10 см³; папір фільтрувальний «синя стрічка».

Хід роботи

Перед початком роботи необхідно приготувати ряд розчинів:

1. Приготування суміші розчинників (змішаних розчинників)

В конічні колби місткістю 100 см³ зливають відповідні об'єми кожного компонента спирту (етилового або ізопропилового) і етеру диетилового (від 1:1 до 1:4) або спирту і хлороформу (1:1) або спирту і толуолу (1:1). На кожні 50 см³ суміші додають 0,5 см³ розчину фенолфталеїну (в 70 %-му етиловому спирті) масової концентрації 10 г/дм³). Суміш нейтралізують розчином калію або натрію гідроксиду молярної концентрації 0,1 моль/дм³ до ледве помітного рожевого кольору.

Розчин повинен бути свіжеприготовленим.

2. Приготування розчинів калію або натрію гідроксиду

Для приготування розчину калію гідроксиду (KOH) молярної концентрації 0,1 моль/дм³ наважку реактиву масою 5,611 г поміщають у мірну колбу місткістю 1 дм³, розчиняють у 0,7–0,8 дм³ дистильованої води, старанно перемішують і доводять цією ж водою до мітки. При приготуванні розчину калію гідроксиду молярної концентрації 0,5 моль/дм³ наважку цього реактиву збільшують у 5 разів. Аналогічно водному розчину за необхідності готують спиртовий розчин калію гідроксиду.

Приготування за необхідності розчинів натрію гідроксиду (NaOH) молярної концентрації 0,1 моль/дм³ і 0,5 моль/дм³ проводять таким же чином, як і калію гідроксиду, але для приготування розчину молярної концентрації 0,1 моль/дм³ беруть наважку 4,0 г NaOH.

Термін зберігання розчинів калію і натрію гідроксиду при кімнатній температурі в закритій корком посудині – не більше 1 місяця.

3. Приготування проби

Приготування проби проводять наступним чином: пробу олії, яка аналізується, ретельно перемішують та фільтрують за температури 15 – 20 °С. За відсутності в пробі олії летких жирних кислот фільтрувати пробу можна в сушильній шафі при температурі 50 °С.

Величина наважки проби олії, яка аналізується, визначається очікуваним значенням кислотного числа в пробі (табл. 3.2). Якщо його неможливо оцінити, то перше попереднє визначення роблять з наважкою масою від 3 г до 5 г.

Таблиця 3.2 – Маса наважки олії для визначення кислотного числа

Очікуване значення кислотного числа, мг КОН (NaOH)/г	Маса наважки олії, г
0,1 – 1	20
1 – 4	10
4 – 15	2,5
15 – 30	0,5
більше 30	0,1

4. Метод визначення кислотного числа олії з використанням холодних розчинників

При проведенні безпосередньо аналізу проби олії на встановлення кислотного числа в конічну колбу місткістю 250 см³ вносять наважку досліджуваної олії. Доливають 50 см³ (для забарвлених олій можна до 150 см³) нейтралізованої суміші холодних обраних розчинників, а також 0,5 см³ спиртового розчину фенолфталеїну масової концентрації 10 г/дм³, і перемішують на магнітній мішалці.

Для пришвидчення розчинення проби можна колбу підігріти на водяній бані, при цьому не допускати закіпання розчинника.

Одержаний розчин олії за постійного перемішування швидко титрують 0,1 моль/см³ розчином калію (або натрію) гідроксиду до появи слабо-рожевого забарвлення, яке стійке протягом не менше 15 с.

У разі кислотного числа олії менше ніж 2 мг КОН (NaOH)/г для титрування використовують мікробюретку.

5. Метод визначення кислотного числа олії з використанням горячого етилового спирту

В конічну колбу місткістю 250 см³ поміщають наважку олії, яку визначають залежно від очікуваного значення кислотного числа (табл. 5).

У другій колбі нагрівають до кипіння 50 см³ етилового (або ізопропілового) спирту, який містить 0,5 см³ розчину фенолфталеїну (розчин в 70 %-му етиловому спирті масової концентрації 10 г/дм³). За температури етилового спирту вище 70° С його титрують 0,1 моль/дм³ водним або спиртовим розчином калію (або натрію) гідроксиду до моменту, коли при додаванні однієї краплини лугу відбувається ледве помітна зміна кольору, що не зникає протягом 15 с.

Нейтралізований етиловий або ізопропіловий спирт з другої колби наливають у першу колбу з дослідною пробою і ретельно перемішують. Потім вміст колби доводять до кипіння і титрують при перемішуванні водним або спиртовим розчином калію (або натрію) гідроксиду молярної концентрації 0,1 моль/дм³ або 0,5 моль/дм³ залежно від очікуваного значення кислотного числа. Вміст колби ретельно збовтують під час титрування.

6. Титрометричний метод визначення кислотного числа олії з потенціометричною індикацією

При використанні титрометричного методу з потенціометричною індикацією додатково застосовують рН-метр (іономер) з межою вимірювання 0 – 14 одиниці рН і ціною поділки більше 0,05 одиниці рН, який має скляний рН-чутливий електрод і хлорсрібний електрод порівняння, що заповнений насиченим розчином калію хлоридом в етанолі.

Наважку олії (див. табл. 2.5) поміщають в скляний стакан місткістю 100 см³ і доливають 50 см³ нейтралізованого одного з холодних розчинників (див. вище). Додатково додають 0,5 см³ спиртового розчину фенолфталеїну масової концентрації 10 г/дм³.

Стакан встановлюють на магнітну мішалку, вмикають її в електромережу і у розчин опускають електроди рН-метра. З бюретки додають по 0,1 см³ титранту (водного чи спиртового розчину КОН або NaOH молярної концентрації 0,1 або 0,5 моль/дм³), кожний раз відмічають показання рН-метра, в одиницях рН або в одиницях електрорушійної сили (ЕРС) у мілівольтах. Титрування закінчують, коли остання частка титранту вже не змінює стійке малинове забарвлення розчину.

Проведення розрахунків

Кислотне число олій за титрування розчином калію гідроксиду обчислюють за формулою:

$$KЧ = \frac{56,1 \cdot C \cdot V}{m},$$

де $KЧ$ – кислотне число проби олії, яка аналізується (мг КОН/г);

C – точне значення молярної концентрації лужного титранту (моль/дм³);

V – об'єм лужного титранту, визначений під час індикаторного титрування або розрахований для еквівалентної точки під час потенціометричного титрування (см³);

m – наважки олії (г);

56,1 – молярна маса калію гідроксиду (г/моль).

При титруванні розчином натрію гідроксиду його молярну масу беруть рівною 40 г/моль.

Іноді для характеристики вмісту вільних жирних кислот в оліях поряд з кислотним числом, використовують показник «кислотність». Його розраховують як масову частку вільних жирних кислот (у відсотках), яку умовно перераховують на одну найхарактернішу для жирнокислотного

складу певної олії кислоти. За неможливості визначення цієї кислоти, перерахунки роблять на стеаринову або олеїнову кислоту.

Кислотність олії обчислюють за формулою:

$$K = \frac{C \cdot V \cdot M}{10 \cdot m} ,$$

де K – кислотне число проби олії, яка аналізується (%);

C – точне значення молярної концентрації лужного титранту (моль/дм³);

V – об'єм лужного титранту, визначений під час індикаторного титрування або розрахований для еквівалентної точки під час потенціометричного титрування (см³);

M – молярна маса вільної жирної кислоти, яка найхарактерніша для даної олії, а за неможливості визначити цю кислоту – то для стеаринової або олеїнової кислоти (г/моль);

m – наважка олії (г);

10 – коефіцієнт перерахунку.

Для визначення точної концентрації лужного титранту наважку стандартної жирної (зокрема, можна стеаринової), маса якої залежить від концентрації титранту і його типу (водний або спиртовий).

Процес проведення аналізу з цією кислотою аналогічний процедурі вимірювання кислотного числа (див. вище), а саме нейтралізують необхідну кількість обраної суміші розчинників, розчиняють в ній наважку стандартної кислоти і проводять титрування лугом (KOH або NaOH).

Точне значення концентрацій розчину лугу обчислюють за формулою:

$$C = \frac{m}{M \cdot V} ,$$

де C – точне значення концентрації розчину лугу (моль/дм³);

m – наважки стандартної жирної кислоти (г);

V – знайдений об'єм розчину лугу, витрачений на титрування (см³);

M – молярна маса стандартної жирної кислоти (г/моль): для бензойної кислоти $M = 122$ г/моль, для стеаринової – $M = 284$ г/моль.

4. ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ МЕТОДИ

Електрофорез (грецьк. *electron* – смола, бурштин; той, що має відношення до електрики та *phoreo* – носити, переносити) – це рух заряджених частинок, який спричинений дією зовнішнього електричного поля. Такими частинками можуть бути молекули речовин, які знаходяться у зарядженій формі – у вигляді катіонів (позитивно заряджені) або аніонів (негативно заряджені).

Крім наявності сумарного електричного заряду, молекули досліджуваних речовин різняться між собою за величиною молекулярної маси (розмірами), що спричинює відмінність за відношенням маси до заряду (m/e), особливо при близьких за величиною та знаком електричних зарядах. Також можуть бути відмінними молекули досліджуваних речовин за просторовою конфігурацією (формою). На всіх цих відмінностях ґрунтується розділення електрично заряджених молекул речовин під дією зовнішнього електричного поля в розчині, який є *буфером* (англ. *buffer* – той, що пом'якшує поштовхи), тобто середовищем, в якому розчиняється або суспензується досліджувана суміш речовин. В цьому і полягає принцип електрофорезу.

За способом розділення компонентів досліджуваної суміші речовин виділяють три основних типи електрофоретичних систем, які мають низку модифікацій: електрофорез з рухомою межею, зональний і стаціонарний електрофорези.

В методі *електрофорезу з рухомою межею* електричне поле накладають до межі між розчином досліджуваної суміші речовин і буфером, який насичує носій, по якому рухаються і розділяються речовини досліджуваної суміші.

При *зональному електрофорезі* досліджуваний зразок (суміш речовин) наносять, як правило, у вигляді плями або смужки на носій, який насичений буфером.

Найпоширенішими модифікаціями зонального електрофорезу є такий на хроматографічному папері, плівках ацетату целюлози, в тонких шарах (зокрема, силікагелю, целюлози, оксиду алюмінію тощо), а також в блоках і колонках із гранульованим середовищем (різноманітні гелі, серед яких найпоширенішими є поліакриламідний, агаровий і агарозний, а також декстрини (сефадекси), скляні, целюлозні та пластмасові порошки тощо).

Стаціонарний (витискування) електрофорез характеризується тим, що через певний час після початку розділення речовин встановлюється стан рівноваги, при якому ширина зон розділених речовин у подальшому не змінюється.

У випадку, коли для електрофоретичного розділення досліджуваних речовин використовується дуже мала кількість матеріалу, широко використовується *капілярний електрофорез (мікроелектрофорез в капілярах)*.

Ідентифікацію розділених речовин на електрофореграмі та їхнє кількісне визначення проводять, як правило, спектрофотометричними методами за використання також стандартів досліджуваних речовин.

Лабораторна робота 4.1. Визначення вмісту рослинного (соєвого) білка в м'ясних продуктах методом електрофорезу.

Принцип методу. Білки з м'ясних продуктів (наприклад, фаршів), які складаються з суміші тваринних і рослинних білків екстрагують після теплової денатурації і проводять їх розділення методом електрофорезу в поліакриламідному гелі.

Масову частку у відсотках соєвих білків у білковій суміші визначають за сумою площин піків, які відповідають на денситограмі білковим зонам соєвого білка (мол. маса 65–75 кДа).

Матеріал для дослідження: м'ясо тварин, м'ясний фарш, що містить соєву добавку.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: прилад для проведення вертикального електрофорезу (стабілізація джерела живлення за параметрами електричного струму і напруги, максимальний струм 250 мА, а напруга – 250 В і цифрова ідентифікація); терези аналітичні 2-го класу точності; водяна баня; термостат; центрифуга (5000 об/хв); термометр; денситометр; рН-метр (іономір); мікроподрібнювач тканин; дистильована вода; хлористоводнева кислота стандарт-титр 0,1 моль/дм³; хлористоводнева кислота з масовою часткою основної речовини 35–38 %; льодяна оцтова кислота; спирт етиловий; трихлороцтова кислота (сухий порошок); гліцерин; N, N, N', N'-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД); акриламід; N, N'-етиленбісакриламід (МБА); 2-аміно-2(гідрокисметил)-1,3-про-пандіол (Трис); натрію додецилсульфат (Na-ДДС); амонію персульфат; барвник Кумассі блакитний R-250; гліцин; 2-меркаптоетанол; бромфеноловий блакитний; соєвий ізолят, який містить не менше 85 % білка; суміш маркерів молекулярної маси білків (27–180 кДа); колби мірні ємністю 25 см³, 50, 100, 1000 і 2000 см³; бутилі скляні для розчинів; воронки скляні; піпетки об'ємом 1–10 см³; ступка порцелян-нова; циліндри ємністю 25 см³, 50 і 1000 см³; склянки хімічні ємністю 50 см³, 100, 250 і 1000 см³; дозатор піпетковий змінного об'єму; мікрошприц або мікропіпетка об'ємом 100 мм³; пробірки пластикові з кришкою типу «Еппендорф» ємністю 1 або 2 см³.

Хід роботи

Перед початком роботи готують ряд розчинів:

1. Розчин хлористоводневої кислоти молярної концентрації 0,1 моль/дм³. У мірну колбу ємністю 1 дм³ додають вміст ампули з стандарт-

титром хлористоводневої кислоти $0,1 \text{ моль/дм}^3$, ампулу додатково ополіскують дистильованою водою, переносять цей об'єм у колбу і доводять дистильованою водою до мітки.

2. Приготування Трис-НСІ буферу (рН 6,8) для солюбілізації білків.

Наважку Трис масою $1,211 \text{ г}$ вносять у мірну колбу ємністю 100 см^3 розчиняють у приблизно 20 см^3 дистильованої води та доводять об'єм розчину цією водою до мітки.

У мірну колбу ємністю 50 см^3 поміщають 25 см^3 приготовленого розчину Трис ($0,1 \text{ моль/дм}^3$), додають $22,5 \text{ см}^3$ розчину хлористо-водневої кислоти молярної концентрації $0,1 \text{ моль/дм}^3$ і доводять об'єм у колбі дистильованою водою до мітки.

3. Приготування розчинів для електрофорезу.

Розчин 1: наважку акриламід масою 30 г і N, N'-етиленбісакри-ламід масою $0,15 \text{ г}$ розчиняють у мірній колбі ємністю 100 см^3 у невеликій (приблизно 20 см^3) кількості дистильованої води, а потім цією водою доводять об'єм у колбі до мітки.

Розчин 2: наважку Трис масою $18,2 \text{ г}$ і натрію додецилсульфату (Na-ДДС) масою $0,4 \text{ г}$ розчиняють у мірній колбі ємністю 100 см^3 у невеликій (приблизно 20 см^3) кількості дистильованої води, встановлюють концентрованою хлористоводневою кислотою рН $8,8$ і доводять дистильованою водою об'єм у колбі до мітки.

Розчин 3: наважку Трис масою $9,1 \text{ г}$ і Na-ДДС масою $0,4 \text{ г}$ розчиняють у мірній колбі ємністю 100 см^3 у невеликій (приблизно 20 см^3) кількості дистильованої води, встановлюють концентрованою хлористоводневою кислотою рН $8,8$ і доводять дистильованою водою об'єм у колбі до мітки.

Розчин 4: наважку амонію персульфату масою $0,125 \text{ г}$ розчиняють у $1,23 \text{ см}^3$ дистильованої води.

Розчин 5: наважку акриламіді масою 30 г і N, N'-етиленабісакриламіді масою 0,8 г розчиняють у мірній колбі ємністю 100 см³ при-близно в 50 см³ дистильованої води і доводять цією водою об'єм у колбі до мітки.

4. Приготування електродного буферу. Наважку Na-ДДС масою 20 г розчиняють у 80 см³ дистильованої води, отримують 20 %-вий розчин Na-ДДС. У мірну колбу ємністю 2 дм³ додають 40 см³ цього 20 %-го розчину Na-ДДС, наважку 24 г Трис і наважку 115,0 г гліцину, доводять об'єм у колбі до мітки дистильованою водою і ретельно перемішують.

5. Приготування розчину барвника для гелю. До наважки барвника Кумасі блакитного R-250 масою 1,1 г додають 200 см³ етилового спирту, 50 см³ льодяної оцтової кислоти, 200 см³ дистильованої води і ретельно перемішують.

6. Приготування розчину, який знебарвлює гель. До 500 см³ етилового спирту додають 350 см³ льодяної оцтової кислоти і 2 дм³ дистильованої води, ретельно перемішують.

7. Приготування буферу для розчинення маркерних білків. Наважку 50 мг бромфенолового блакитного змішують з 99,95 см³ дистильованої води. До 0,4 см³ 2-меркаптоетанолу по черзі приливають 0,8 см³ 20 %-го розчину Na-ДДС, 0,4 см³ Трис-НСl буферу (рН 6,8), 0,8 см³ 0,05 %-го розчину бромфенолового блакитного, 5 см³ гліцину і 5 см³ дистильованої води.

Отриманий розчин використовують свіжоприготовленим, зберігання при температурі 4 °С не більше двох діб.

8. Приготування розчинів маркерних білків із молекулярною масою 27–180 кДа і масовою концентрацією білка 1 мкг/мм³. У пластиковій пробірці типу «Еппендорф» розчиняють наважку масою 50 мкг готової суміші маркерних білків із молекулярною масою 27–180 кДа в 50 мм³ буфера для розчинення маркерних білків (див. вище).

Розчин зберігають при температурі –20 °С протягом одного тижня.

9. Приготування фіксуючого розчину. Наважку 112,5 г трихлороцтової кислоти розчиняють у 87,5 см³ дистильованої води (отримують 12,5 %-вий розчин трихлороцтової кислоти).

10. Приготування розчинів для отримання поліакриламідних гелів:

1. Приготування розчину для нижнього (сепаруючого) гелю: змішують безпосередньо перед використанням 18 см³ розчину 1 для приготування розчинів для електрофорезу (див. вище), 7,5 см³ розчину 2, 4,3 см³ дистильованої води, 0,01 см³ ТЕМЕД і 0,2 см³ розчину 4.

2. Приготування розчину для верхнього (формуючого) гелю: змішують безпосередньо перед використанням 2,5 см³ розчину 3, 0,1 см³ розчину 4, 1,3 см³ розчину 5, 6,2 см³ дистильованої води, 0,01 см³ ТЕМЕД.

Пробу, яка аналізується, наважкою 200 г подрібнюють на мікроподрібнювачі тканин і зберігають у холодильнику при температурі 0,5 °С протягом доби або при температурі від -20 °до -10 °С у герметичній упаковці впродовж одного тижня.

Перед дослідженням (див. нижче екстракція білків) наважку 1 г гомогенізованої замороженої проби бажано розтерти в порцеляновій ступці з 10 см³ Трис-НСІ буфера (рН 6,8) або буфера для розчинення маркерних білків (див. вище).

У подальшому проводять екстракцію білків проби, яка аналізується.

Для цього наважку мілкоподрібненої проби, яка містить біля 0,2 г загального білка (визначають, як правило, попередньо одним із методів визначення вмісту білка, зокрема можна методом К'ельдаля). Для м'ясних продуктів при відсотковій масовій частці тваринних білків 18 % маса наважки складає 1 г. Цю наважку у випадку поганої розчинності, як вже відмічалось, бажано розтерти в порцеляновій ступці з 10 см³ Трис-НСІ буфера (рН 6,8) або буфера для розчинення маркерних білків (див. вище).

У подальшому цю суміш нагрівають на водяній бані до 75 °С і витримують при цій температурі 30 хв. Суміш центрифугують при

3000 об./хв. упродовж 20 хв. Прозору надосадкову рідину використовують для електрофорезу.

Саме електрофоретичне розділення білків починають із підготовки електрофоретичної касети для досліджень. Два чистих скла, які входять до комплекту електрофоретичної камери знежирюють етиловим спиртом і їх закріплюють у касеті на відстані між ними 1 мм, і при цьому утворюють простір для заливання гелю розміром, як правило $115 \times 115 \times 1$ мм. Потім обережно по краю скла через наконечник піпеткового дозатора заливають суміш нижнього (сепаруючого) гелю на $3/4$ висоти скла. На поверхню залитого гелю наливають дистильовану воду для полімеризації гелю і вирівнювання верхнього краю його поверхні. Процес полімеризації відбувається при температурі 20°C упродовж 1 год. Збільшення часу полімеризації призводить до утворення більш щільного гелю, що спричинює зростання часу для проведення електрофорезу.

Після полімеризації гелю, воду видаляють і зверху заливають верхній (формуючий) гель до верхніх країв скляних пластинок, встановлюють у розчин цього гелю пластикову гребінку для формування в гелі лунок (поглиблень), в які будуть вноситися проби, що аналізуються. Проводять полімеризацію цього гелю протягом 20–30 хв.

Касету з полімеризованими гелями закріплюють в електрофоретичній камері. Туди ж поміщають електроди, спіраль для охолодження буферу і заливають в електрофоретичну камеру до країв електродний буфер (див. вище) так, щоб буферний розчин покривав верхній край касети з гелем.

Після підготовки електрофоретичної камери до роботи в кожну лунку в гелі вносять мікрошприцем або мікропіпеткою попередньо підготовлені розчини білкових проб в об'ємі $1\text{--}2\text{ мм}^3$, які містять білок із розрахунку 10–20 мкг білка на одну лунку. Вводять проби в лунки обережно, щоби розчин білка не спливав з дна лунки.

В окрему лунку поряд із пробом, яка аналізується, вносять 5 мм^3 розчину маркерних білків із масовою концентрацією 1 мкг/мм^3 .

Підключають електрофоретичну камеру (блок) до електромережі і проводять процес електрофорезу при постійному електричному струмі $2,5 \text{ мА/см}^2$ упродовж 1–2 год. Час проведення електрофорезу залежить від стану гелю, а також відстані, яку необхідно пройти білкам для їх розділення.

Після проходження білків через верхній гель, їх смуги збираються на межі двох гелів, входять у нижній сепаруючий гель і відбувається розділення на фракції. Процес завершується при виході у буфер із гелю бромфенолового блакитного, за фронтом проходження якого слідкують. У цей час найрухливіші білки будуть у гелі приблизно в 2 см від нижнього краю гелю.

Електрофоретична рухливість кожного білка (шлях, який він проходить, шлях його смуги) прямо пропорційна його молекулярній масі.

На завершенні електрофорезу прилад відключають від електроживлення а електродний буфер зливають. Камеру розбирають і відділяють гель від поверхні скла. Його поміщають у 12,5 %-вий розчин трихлороцтової кислоти (фіксує розчин, див. вище), витримують 15 хв., зливають кислоту і промивають гель дистильованою водою. Гель переносять у барвнуючий розчин Кумасі блакитного R-250 і витримують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Потім знову гель промивають два рази дистильованою водою. Знебарвлення гелю проводять у знебарвлюючому розчині протягом 3 год.

Наслідком цих процедур є отримання поліакриламідного гелю, в якому видно забарвлені в синій колір смуги білків проби, яка аналізується та смуги, що відповідають маркерним білкам із відомою молекулярною масою. Порівняння білкових смуг проби, яка аналізується, зі смугами молекулярних білків на електрофореграмі дозволяє зробити висновок про фракційний склад білків проби і молекулярну масу кожної фракції, а також виявити характерні смуги білків рослинного походження. Але для цього будують калібрувальний

графік на основі дослідження модельної м'ясо-рослинної проби (містить м'ясо тварин і соєвий ізолят).

За використання цього калібрувального графіка проводять також визначення відсоткової масової частки рослинного соєвого білка в м'ясних продуктах. Для цього порівнюють обраховані денситограми (записи екстракції (оптичної густини) при скануванні гелів за допомогою спеціального приладу – денситометра, який обраховує також площу піків) білків проби, яка аналізується, і білків-маркерів молекулярної маси соєвого ізоляту.

Побудування калібрувального графіка

Наважки по 100 г м'яса тварин (свинини, яловичини, баранини, які містять тваринного білка не менше 18 %) змішують із наважками 1 г, 5, 10, 15, 20, 50 і 85 г соєвого ізоляту, що містить не менше 85 % рослинного білка. Точний вміст тваринного і рослинного білка попередньо уточнюють одним із методів визначення білка, зокрема, можна методом К'ельдаля.

Кожну суміш подрібнюють на мікроподрібнювачі тканин протягом 30 хв до утворення гомогенної маси. Отримують модельні м'ясо-рослинні суміші, відсоткова масова частка рослинного соєвого білка, в яких відносно масової частки загального білка, дорівнює відповідно 4,5 %, 19,1, 32,1, 41,5, 48,6, 70,2 і 80 %.

У подальшому цю двокомпонентну м'ясо-рослинну суміш піддають електрофоретичному розділенню і проводять денситометрію виявлених характеристичних білкових смуг, які відповідають соєвим білкам, що мають молекулярну масу 65–75 кДа. При використанні показників денситометра автоматично обчислюють суму площин піків, які відповідають зоні соєвих білків у м'ясо-рослинній суміші. Ця сума площин піків пропорційна вмісту соєвої добавки в м'ясних продуктах.

За результатами досліджень будують калібрувальний графік, де по вісі абсцис відкладають відсоткову масову частку соєвих білків у зразку, який

аналізується (у %), а по вісі ординат – суму площин піків в області молекулярних мас 65–75 кДа (ум. од. або мм²).

Проведення розрахунків

Відсоткову масову частку рослинного соєвого білка в м'ясних продуктах відносно відсоткової масової частки загального білка обчислюють за формулою:

$$B_p = \frac{C}{B_k} \cdot 100,$$

де B_p – значення відсоткової масової частки соєвого білка в пробі м'ясного продукту, яка аналізується, відносно відсоткової масової частки загального білка (%);

C – значення відсоткової масової частки соєвого білка в пробі, яка аналізується, що знайдена за калібрувальним графіком (%);

B_k – значення відсоткової масової частки загального білка в про-бі, яка аналізується (визначена одним із методів, зокрема можна мето-дом К'ельдаля);

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки (%).

Лабораторна робота 4.2. Визначення вмісту амінокислот (лізину, метіоніну, треоніну, цистину і аргініну) в комбікормах і комбікормовій сировині методом капілярного електрофорезу.

Принцип методу. Капілярний, зональний електрофорез застосовується, насамперед, для аналізу малих кількостей досліджуваного матеріалу. Він має ряд переваг у порівнянні з методами класичного електрофорезу: дуже висока ефективність розділення, просте детектування в режимі реального часу, короткий час аналізу, можливість високого ступеню автоматизації, невеликі витрати реактивів.

Метод базується на розділенні в кварцовому капілярі під дією зовнішнього електричного поля іонних форм амінокислот (лізину, метіоніну, треоніну, цистину і аргініну) та їх детектуванні за поглинанням світла в ультрафіолетовій (УФ) області спектру (190–200 нм).

Матеріал для дослідження: комбікорми, комбікормова сировина.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: система капілярного електрофорезу (прилад) із підтримкою робочої температури капіляру, спектрофотометричним детектором, який призначений для реєстрації екстинкції (оптичної густини) в ультрафіолетовій області (190–200 нм), постачена кварцовим капіляром (ефективна довжина 65 см, внутрішній діаметр 0,5 мм) типу «Капель-105» з програмно-апаратним комплексом збору і обробки даних типу «Мульти Хром для Windows», версія не нижче 1,5; терези аналітичні 2-го класу точності; побутовий холодильник; рН-метр (іономір); центрифуга лабораторна (6000 об/хв); шафа сушильна з терморегулятором, яка забезпечує підтримку температури ($110 \pm 2^\circ\text{C}$); електронагрівач (електроплитка побутова); вентилятор; водяна баня; штатив для пробірок; дистильована вода; натрію гідроксид (NaOH), розчин із молярною концентрацією 0,5 моль/дм³; хлористоводнева кислота (HCl), розчини молярних концентрацій 6,0 моль/дм³; 1,0 і 0,1 моль/дм³; β -циклодекстрин; натрій тетраборнокислий, стандарт-титр; натрію тетраборнокислий 10-водневий ($\text{N}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) розчини молярних концентрацій 0,5; 0,2 моль/дм³; кислота бензойна; стандарти лізину (лізину моногідрохлорид), метіоніну, треоніну, цистину, аргініну, всі фірми «Флука» (допускається використання L-, D- і суміші DL-амінокислот); ексікатор; бутилі з поліетилену ємністю 10 см³, 20, 100, 500 і 1000 см³; колби конічні з шліфом ємністю 100 і 1000 см³; колби мірні ємністю 50 см³, 100 і 1000 см³; воронки; склянки для зважування (бюкси); піпетки градуйовані ємністю 1–10 см³; пробірки ємністю 10 см³; пластмасові пробірки з кришкою типу «Ешпендорф» ємністю 1, 5 см³; ампули скляні з перетяжкою ємністю 20 см³; віали скляні з герметично загвинченою кришкою ємністю 15 см³ для кислотного гідролізу; шприци або мікропіпетки змінного об'єму 5–50 мм³, 50–200, 200–1000 мм³; фільтри целюлозно-ацетатні (розмір пор 0,2 мкм, діаметр 25 мм); насадки для фільтрів; фільтрувальний папір «синя стрічка».

Хід роботи

Перед початком роботи готують ряд розчинів:

1. Приготування розчину хлористоводневої кислоти молярної концентрації 6,0 моль/дм³. Змішують 100 см³ концентрованої хлористоводневої кислоти з таким же об'ємом дистильованої води.

Термін зберігання при кімнатній температурі – необмежений.

2. Приготування розчину хлористоводневої кислоти молярної концентрації 1,0 моль/дм³. У мірну колбу ємністю 100 см³ поміщають 8,3 см³ концентрованої хлористоводневої кислоти і доводять об'єм до мітки дистильованою водою.

Термін зберігання при кімнатній температурі – необмежений.

3. Приготування хлористоводневої кислоти молярної концентрації 0,1 моль/дм³. Розчин готують із стандарт-титру цієї кислоти.

Термін зберігання при кімнатній температурі – необмежений.

4. Приготування розчину натрію гідроксиду молярної концентрації 0,5 моль/дм³. У мірну колбу ємністю 100 см³ поміщають 2 г натрію гідроксиду, розчиняють приблизно в 50 см³ і доводять об'єм до мітки дистильованою водою.

Розчин зберігають в ємкості з поліетилену з щільно загвинченою кришкою не більше 2 місяців при кімнатній температурі.

5. Приготування розчину натрію тетраборнокислового молярної концентрації 0,05 моль/дм³. Розчин готують із стандарт-титру натрію тетраборнокислового 10-водневого. При відсутності такого стандарт-титру 19,07 г препарату розчиняють у мірній колбі ємністю 1 дм³ у свіжопрокип'яченій і охолодженій без доступу повітря дистильованій воді. При температурі 20 °С величина рН розчину повинна становити 9,22±0,10.

Термін зберігання при кімнатній температурі – 2 місяці.

6. Приготування буферних розчинів:

Робочий буферний розчин натрію тетраборнокисломо молярної концентрації 0,2 моль/дм³. Розчин натрію тетраборнокисломо 10-вод-невомо молярної концентрації 0,05 моль/дм³ (приготування див. вище) в об'ємі 20 см³ додають у мірну колбу ємністю 50 см³ і доводять до мітки дистильованою водою, ретельно перемішують.

Термін зберігання при кімнатній температурі – 2 місяці.

Приготування робочого буферного розчину для визначення меті-оніну. В пробірці розчиняють 0,114 г β-циклодекстрину в 10 см³ розчину натрію тетраборнокисломо молярної концентрації 0,02 моль/дм³. Отриману суміш закривають корком і нагрівають на водяній бані при температурі 50–70 °С до повного розчинення β-циклодекстрину. Зберігають в ємкості з поліетилену при температурі не нижче 18 °С – не більше двох тижнів.

Перед початком вимірюванням робочі буферні розчини необхідно профільтрувати через ацетатно-целюлозний фільтр, відкинувши перші 1–2 см³ фільтрату, а потім дегазувати центрифугуванням: у пластмасові пробірки типу «Еппендорф» поміщають 0,5 см³ відповідного буферного розчину, щільно закривають кришкою і центрифугують 2 хв зі швидкістю обертання ротора 6000 об/хв.

7. Приготування градуювальних розчинів амінокислот:

Приготування запасних розчинів амінокислот. Для приготування розчинів лізину, треоніну і аргініну наважку кожного з них, а саме лізину моногідрохлориду 0,3124 г (лізину дигідрохлориду – 0,3747 г, лізину моногідрату – 0,2808 г), метіоніну – 0,1000, треоніну – 0,1000 г, цистину – 0,0500 г, аргініну – 0,1000 г поміщають у мірну колбу ємністю 100 см³, розчиняють приблизно в 50 см³ дистильованої води перемішують і доводять до мітки дистильованою водою. У випадку цистину спочатку в колбу вносять 10 см³ хлористоводневої кислоти молярної концентрації 0,1 моль/дм³ і вже потім об'єм розчину доводять до мітки дистильованою водою. Концентрація

амінокислот у таких мірних колбах буде: лізину – 2,5 г/дм³; метіоніну – 1,0 г/дм³; треоніну – 1,0 г/дм³; цистину – 0,5 г/дм³; аргініну – 1,0 г/дм³.

Термін зберігання запасних розчинів амінокислот у герметично закритому посуді при температурі (4–6 °С) – не більше 6 місяців.

Приготування запасного розчину бензойної кислоти масової концентрації 1,0 г/дм³. У мірну колбу ємністю 100 см³ поміщають 0,1 г бензойної кислоти, розчиняють у 20 см³ розчину натрію тетраборно-кислого молярної концентрації 0,05 моль/дм³, доводять об'єм розчину в колбі до мітки дистильованою водою і перемішують.

Термін зберігання при кімнатній температурі – 6 місяців.

Приготування робочого розчину бензойної кислоти масової концентрації 5 мг/дм³. У мірну колбу ємністю 100 см³ поміщають 0,5 см³ запасного розчину бензойної кислоти масової концентрації 1,0 г/дм³ (див. вище), доводять об'єм розчину в колбі до мітки дистильованою водою і перемішують.

Термін зберігання при кімнатній температурі – 1 місяць.

Приготування змішаного розчину аргініну і бензойної кислоти. В мірну колбу ємністю 25 см³ поміщають 5 см³ запасного розчину аргініну концентрації 1,0 г/дм³ і 0,625 см³ запасного розчину бензойної кислоти (див. вище). Доводять об'єм розчину в колбі до мітки дистильованою водою і перемішують. Масові концентрації в суміші: аргініну – 200 мг/дм³, бензойної кислоти – 25 мг/дм³.

Термін зберігання при кімнатній температурі – 1 місяць.

Приготування вихідної градуовальної суміші 1. В поліетиленовій ємності об'ємом 20 см³ змішують по 2 см³ запасних розчинів лізину, метіоніну, треоніну і цистину, а також аргініну з бензойною кислотою (див. вище). Масові концентрації компонентів у розчині: лізину – 500 мг/дм³, метіоніну – 200 мг/дм³, треоніну – 200 мг/дм³, цистину – 100 мг/дм³, аргініну – 40 мг/дм³, бензойної кислоти – 5 мг/дм³.

Термін зберігання в герметично закритому посуді при температурі 4–6 °С – 1 місяць.

Приготування робочої градувальної суміші 2. В поліетиленовій ємкості об'ємом 10 см³ змішують 1 см³ робочої градувальної суміші 1 та 0,8 см³ змішаного розчину аргініну і бензойної кислоти (див. вище), а також 3,2 см³ дистильованої води. Масові концентрації компонентів суміші, мг/дм³: лізину – 100, метіоніну – 40, треоніну – 40, цистину – 20, аргініну – 40, бензойної кислоти – 5.

Перед початком вимірювань також необхідно підготувати капіляр до роботи. Новий капіляр готують у відповідності до «Інструкції щодо експлуатації».

Якщо напередодні капіляр залишали заповнений дистильованою водою, то перед початком роботи його необхідно промити розчином хлористоводневої кислоти молярної концентрації 1,0 моль/дм³ протягом 10 хв, дистильованою водою протягом 3 хв, розчином натрію гідроксиду молярної концентрації 0,5 моль/дм³, знову дистильованою водою 3 хв, а потім робочим буферним розчином натрію тетраборнокислового молярної концентрації 0,02 моль/дм³ упродовж 10 хв.

Проведення безпосередніх вимірювань починають із гідролізу проби, що аналізується (комбікорм або комбікормова сировина). Для цього наважку проби 0,1 г поміщають у скляну віалу або ампулу з перетяжкою, додають 10 см³ розчину хлористоводневої кислоти молярної концентрації 6,0 моль/дм³. При гідролізі в скляній ампулі її запаюють у полум'ї газового пальника в місці перетяжки, а у віалі – щільно загвинчують кришкою. Потім ампулу або віалу поміщають в ексікатор, який ставлять в сушильну шафу на 14–16 год при температурах 100 °С.

Після закінчення гідролізу віалу або ампулу виймають із ексікатора і охолоджують до кімнатної температури. Вміст перемішують і фільтрують у конічну колбу з шліфом ємністю 25 см³, відбираючи у склянку (бюкс) 1 см³

фільтрату і випаровують досуха в потоці теплого повітря вентилятора. Стаканчик охолоджують при кімнатній температурі, а сухий залишок розчиняють у 1 см^3 дистильованої води. Цей розчин і є випробувальним.

У подальшому в залежності від об'єкту дослідження і передбачуваного вмісту амінокислот розводять випробувальний розчин дистильованою водою: для зернових культур рекомендується в 2 рази, для рослинних (шрот, жмих) і тваринних продуктів – у 5 разів. Критерієм оптимального розведення є те, що концентрація амінокислот у розведеному випробувальному розчині не повинна перевищувати їх концентрацію в робочій градувальній суміші 2.

Аліквоту в $0,5 \text{ см}^3$ отриманого розчину поміщають у пробірку типу «Еппендорф», центрифугують для дегазації протягом 5 хв при 6000 об./хв. і використовують для електрофоретичного розділення (робочий випробувальний розчин).

У випадку ускладнень в розмітці піків амінокислот на електрофореграмі, сухий залишок розчиняють в 1 см^3 розчину бензойної кислоти масової концентрації 5 мг/дм^3 , а розведення проводять тим же розчином бензойної кислоти.

Електрофоретичний аналіз робочого випробувального розчину проводять 2 рази: а) для визначення лізину, треоніну, цистину і аргініну – в буферному розчині натрію тетраборнокисломої молярної концентрації $0,02 \text{ моль/дм}^3$ при температурі $20 \text{ }^\circ\text{C}$; б) для визначення метіоніну – в буферному розчині для визначення метіоніну (натрію тетраборнокисломої з добавкою β -циклодекстрину, див. вище) при температурі $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

У системі капілярного електрофорезу режим аналізу проб, які аналізуються, наступний: електрична напруга 20 кВ; час аналізу лізину, треоніну, цистину і аргініну – 17 хв при температурі $20 \text{ }^\circ\text{C}$, а метіоніну – 10 хв при температурі $40 \text{ }^\circ\text{C}$; детектування – фотометричний детектор в ультрафіолетовій області (190–200 нм).

На завершенні аналізу проводять автоматичну обробку електрофореграми програмно-аналітичним комплексом типу «Мульти Хром для Windows», вираховують масову концентрацію кожної амінокис-лоти в пробі, яка аналізується, при порівнянні площ піків цих аміно-кислот із такими в робочій градувальній суміші 2.

Проведення розрахунків

Відсоткову масову частку кожної з амінокислот обчислюють за формулою:

$$X_i = \frac{C_i \cdot V_{гидр.} \cdot Q}{m} \cdot 100,$$

де X_i – відсоткова масова частка i -амінокислоти (%);

C_i – масова концентрація i -амінокислоти (мг/дм³);

$V_{гидр.}$ – об'єм гідролізату (0,01 дм³);

Q – коефіцієнт розведення, який дорівнює відношенню загального об'єму випробувального розчину, що отриманий після розведення, до об'єму взятої до розведення частини;

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки (%).

Лабораторна робота 4.3. Визначення вмісту водорозчинних вітамінів В₁ (тіамінхлориду), В₃ (пантотенової кислоти), В₆ (піридоксину), В_с (фолієвої кислоти) і С (аскорбінової кислоти) у преміксах методом капілярного електрофорезу.

Принцип методу. Премікси – це збагачувальні суміші біологічно активних речовин, які є продуктами мікробіологічного і хімічного синтезу, що використовуються для підвищення харчової цінності комбікормів та поліпшення їх біологічної дії на організм тварин. Особливу увагу серед преміксів приділяють вітамінам – органічним сполукам різної хімічної

природи, які, в основному, не синтезуються в організмі ссавців і у невеликих кількостях необхідні для нормального функціонування організму.

Один із ефективних методів визначення вмісту водорозчинних вітамінів – загальний капілярний електрофорез, який базується на міграції і розділенні іонних форм аналізуємих вітамінів під дією зовнішнього електричного поля внаслідок їх різної електрофоретичної рухливості та їх детектуванні за поглинанням світла в ультрафіолетовій області спектра (190–200 нм).

Матеріал для дослідження: премікси.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: система капілярного електрофорезу з діапазоном виміру робочої напруги від 1 до 25 кВ, підтримкою робочої температури капіляру, спектрофотометричним детектором, який призначений для реєстрації екстинкції (оптичної густини) в ультрафіолетовій області (190–200 нм), облаштована кварцовим капіляром (ефективна довжина 65 см, внутрішній діаметр 0,5 мм) типу «Капель-105» з програмно-апаратним комплексом для збору і обробки даних типу «Мульти Хром для Windows», версія не нижче 1,5; терези аналітичні 2-го класу точності; холодильник побутовий; рН-метр (іономір); центрифуга лабораторна (6000 об/хв); шафа сушильна з терморегулятором, який забезпечує підтримку температури ($150 \pm 2^\circ\text{C}$); електронагрівач (електроплитка побутова); вентилятор; водяна баня; пристрій для перемішування; штатив для пробірок; дистильована вода; натрію гіроксид (NaOH), розчин із молярною концентрацією $0,5 \text{ моль/дм}^3$; хлористоводнева кислота (HCl); розчини молярних концентрацій 6,0; $1,0 \text{ моль/дм}^3$, об'ємною концентрацією 1 %; кислота борна, розчин молярної концентрації $0,2 \text{ моль/дм}^3$; натрію сульфат безводний, розчин молярної концентрації $0,1 \text{ моль/дм}^3$; кислота оксалатна, розчин із масовою часткою 1 %; натрій тетраборнокислий, стандарт-титр; натрію тетраборнокислий 10-водневий ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), молярних концентрацій 0,05 і $0,01 \text{ моль/дм}^3$; натрію додецилсульфат (Na-ДДС); стандарти вітамінів B_1 (тіамінхлориду), B_3

(пантотенової кислоти, кальцієва сіль), В₆ (піридоксину гідрохлориду), В_с (фолієвої кислоти) і С (аскорбінової кислоти), все фірми «ICN»; пробірки центрифужні поліпропіленові; пластмасові пробірки з кришкою типу «Еппендорф» ємністю 1, 5 см³; посуд з темного скла з герметично загвинченими кришками і тефлоновими прокладками ємністю 10–40 см³; колби плоскодонні з притертими корками ємністю 100 і 200 см³; склянки хімічні ємністю 50 см³, 100 і 200 см³; колби мірні ємністю 50 і 100 см³; циліндри ємністю 25 см³; піпетки градуйовані ємністю 1–10 см³; мікродозатори перемінного об'єму 10–100 мм³, 100–1000, 1000–5000 мм³; наконечники поліпропіленові для мікродозаторів об'ємом 0,3 см³; 1,0 і 5,0 см³; фільтри целюлозно-ацетатні (розмір пор 0,2 мкм, діаметр 25 мм); насадки для фільтрів.

Хід роботи

Перед початком роботи готують ряд розчинів:

1. Приготування розчину хлористоводневої кислоти молярної концентрації 6,0 моль/дм³. Змішують 50 см³ концентрованої хлористоводневої кислоти з таким же об'ємом дистильованої води. Розчин зберігають у плоскодонній колбі з притертим корком.

Термін зберігання – необмежений.

2. Приготування розчину хлористоводневої кислоти молярної концентрації 1,0 моль/дм³. Змішують 17 см³ хлористоводневої кислоти молярної концентрації 6,0 моль/дм³ (див. вище) з 83 см³ дистильованої води. Розчин зберігають у плоскодонній колбі з притертим корком.

Термін зберігання – необмежений.

3. Приготування розчину хлористоводневої кислоти масової частки 1 %. Змішують 3 см³ розчину хлористоводневої кислоти молярної концентрації 6,0 моль/дм³ (див. вище) з 98 см³ дистильованої води і ретельно перемішують. Розчин зберігають у плоскодонній колбі з притертим корком.

Термін зберігання – необмежений.

4. Приготування розчину натрію гідроксиду молярної кон-центрації 0,5 моль/дм³. У мірну колбу ємністю 100 см³ поміщають 2,0 г натрію гідроксиду, розчиняють приблизно в 50 см³ дистильованої води і доводять об'єм до мітки дистильованою водою. Розчин зберігають в ємкості з поліетилену з сильно загвинченою кришкою.

Термін зберігання – 2 місяці.

5. Приготування розчину борної кислоти молярної концен-трації 0,2 моль/дм³. У мірну колбу ємністю 100 см³ поміщають 1,236 г борної кислоти і розчиняють приблизно в 50 см³ дистильованої води, доводять об'єм до мітки дистильованою водою. Розчин зберіга-ють в ємності з поліетилену і щільно загвинченою кришкою.

Термін зберігання – необмежений.

6. Приготування розчину оксалатої кислоти відсоткової масової частки 1 %. У мірній колбі ємністю 100 см³ в 40–50 см³ дистильованої води розчиняють 1,0 г безводної оксалатної кислоти або 1,4 г 2-водневої оксалатної кислоти. Об'єм колби доводять до мітки дистильованою водою і перемішують. Розчин зберігають у скляному посуді з притертим корком.

Термін зберігання – необмежений.

7. Приготування розчину натрію тетраборнокислого (Na₂B₄O₇·10H₂O) молярної концентрації 0,05 моль/дм³. Розчин отримують із стандарт-титру. За його відсутності, розчин готують нас-тупним чином: наважку 10-водного натрію тетраборнокислого масою 19,071 г розчиняють у мірній колбі ємністю 1 дм³ у свіжопрокип'яченій і охолодженій дистильованій воді (рН розчину при 20 °С – 9,22±0,10), доводять об'єм розчину до мітки такою ж дистильованою водою. Розчин зберігають у поліетиленовій ємкості з щільно загвинченою кришкою.

Термін зберігання – 2 місяці.

8. Приготування розчину натрію тетраборнокислого (Na₂B₄O₇·10H₂O) молярної концентрації 0,01 моль/дм³. У мірну колбу

ємністю 100 см^3 додають 20 см^3 розчину натрію тетраборно-кислого молярної концентрації $0,05 \text{ моль/дм}^3$ (див. вище), об'єм колби доводять до мітки дистильованою водою. Розчин зберігають у поліетиленовій ємкості з щільно загвинченою кришкою.

Термін зберігання – 2 місяці.

9. Приготування ведучого електроліту 1. У хімічну склянку ємністю 100 см^3 додають 40 см^3 розчину натрію тетраборнокислого молярної концентрації $0,05 \text{ моль/дм}^3$ і 20 см^3 розчину борної кислоти з молярною концентрацією $0,2 \text{ моль/дм}^3$, ретельно перемішують. Розчин зберігають у скляній ємкості з притертим корком.

Терміни зберігання – 2 місяці.

10. Приготування ведучого електроліту 2. У мірну колбу ємністю 25 см^3 поміщають $0,756 \text{ г}$ натрію додецилсульфату (Na-ДДС), додають 15 см^3 ведучого електроліту 1 і ретельно перемішують. Об'єм у колбі доводять до мітки цим же розчином електроліту 1. Розчин зберігають у скляній ємкості з притертим корком.

Терміни зберігання – 1 місяць.

Примітка: безпосередньо перед початком вимірювань ведучі електроліти 1 і 2 необхідно: 1) профільтрувати через ацетатно-целюлозний фільтр, відкинувши перші $1,0\text{--}1,5 \text{ см}^3$ порції фільтрату; 2) дегазувати центрифугуванням протягом 5 хв при швидкості обертання ротора 6000 об/хв .

11. Приготування розчину натрію сульфіту (Na_2SO_3) молярної концентрації $0,1 \text{ моль/дм}^3$. У мірну колбу ємністю 50 см^3 поміщають $0,63 \text{ г}$ безводного натрію сульфіту, додають 30 см^3 дистильованої води, перемішують до повного розчинення реактиву і доводять об'єм розчину в колбі дистильованою водою до мітки.

Використовують розчин тільки в день приготування.

12. Приготування екстрагуючого розчину для отримання ви-тяжки вітамінів із проби, що аналізується. У хімічній склянці ємністю 250 см³ змішують розчин натрію тетраборнокислого молярної концентрації 0,05 моль/дм³ з розчином натрію сульфату молярної концентрації 0,1 моль/дм³ у співвідношенні 3:2.

Розчин зберігають у скляній ємкості з притертим корком і використовують тільки в день приготування.

13. Приготування градуювальних розчинів вітамінів:

Приготування запасних розчинів вітамінів В₁ (тіамінхлориду), В₃ (пантотенової кислоти), В₆ (піридоксину), В_с (фолієвої кислоти) і С (аскорбінової кислоти) масової концентрації 1 мг/см³. Наважки вітамінів у відповідності з даними Таблиці 4.1 вносять в окремі ємкості з темного скла і розчиняють у 5 см³ дистильованої води. Розчини зберігають у герметично закритих ємкостях при 3–5 °С.

Термін зберігання – 3 місяці.

Таблиця 4.1. Наважки вітамінів із урахуванням їх форм, які необхідні для приготування запасних розчинів, і коефіцієнт перерахунку наважки на масу відповідного вітаміну

Вітамін у формі використання	Маса наважки, г	Коефіцієнт перерахунку, f
В ₁ (тіамінхлорид)	0,0056	0,833
В ₃ (кальцієва сіль пантотенової кислоти)	0,0054	0,916
В ₆ (піридоксин гідрохлорид)	0,0061	0,823
В _с (фолієва кислота)	0,0050	1,000
С (аскорбінова кислота)	0,0100	1,000

Масові концентрації вітамінів у кожному розчині обчислюють за формулою:

$$C_{Ii} = \frac{m_i \cdot f_i}{V_i},$$

де C_{Ii} – масова концентрація i -го вітаміну в запасному розчині, мг/см³;

m_i – маса наважки відповідного вітаміну у формі використання (мг);

f_i – коефіцієнт перерахунку маси наважки на масу відповідного вітаміну (див. табл. 4.1);

V_i – об'єм запасного розчину відповідного вітаміну (см³).

Приготування градувальник розчинів вітамінів. Запасні розчини кожного вітаміну поміщають в скляні ємкості в об'ємах, які вказані у табл. 4.2. Додають 1065 мм³ розчину натрію тетраборнокислового молярної концентрації 0,01 моль/дм³, 240 мм³ розчину оксалатної кислоти відсоткової масової частки 1 %, 60 мм³ розчину хлористо-водневої кислоти об'ємної концентрації 1 % і ретельно перемішують.

Таблиця 4.2. Об'єм запасних розчинів вітамінів для приготування градувальник розчинів

Вітамін у формі використання	Об'єм запасного розчину, мм ³
В ₁ (тіамінхлорид)	100
В ₃ (кальцієва сіль пантотенової кислоти)	70
В ₆ (піридоксин гідрохлорид),	15
В _с (фолієва кислота)	205
С (аскорбінова кислота)	50

Масові концентрації вітамінів у градувальному розчині обчислюють за формулою:

$$C_{2i} = \frac{C_{1i} \cdot V_i \cdot 1000}{2000},$$

де C_{2i} – масова концентрація i -го вітаміну в градуювальному розчині (мг/дм³);

C_{1i} – масова концентрація відповідного вітаміну в запасному розчині, мг/см³;

V_i – об'єм запасного розчину відповідного вітаміну (мм³);

1000 – коефіцієнт перерахунку кубічних сантиметрів у кубічні дециметри;

2000 – загальний об'єм градуювального розчину (мм³).

Перед початком вимірювання також необхідно приготувати капіляр до роботи. Новий капіляр готують у відповідності до «Інструкції щодо експлуатації».

Якщо напередодні капіляр залишали заповненим дистильованою водою, то перед початком роботи його необхідно промити розчином натрію гідроксиду молярної концентрації 0,5 моль/дм³ і дистильованою водою по 5 хв, а потім розчином ведучого електроліту 1 (див. вище). У випадку, коли капіляр був заповнений ведучим електролітом 1, то на наступний день при використанні методу зонального електро-форезу його промивають свіжоприготовленим ведучим електролітом 1 протягом 10–15 хв.

Після завершення роботи необхідно провести послідовне промивання капіляру дистильованою водою протягом 10 хв, розчином хлористоводневої кислоти молярної концентрації 1 моль/дм³ і знову дистильованою водою по 5 хв, а потім розчином натрію гідроксиду молярної концентрації 0,5 моль/дм³ і ще раз дистильованою водою по 10 хв.

Проводиться також перед початком безпосереднього аналізу проби градуювання системи і контроль стабільності градуювальної характеристики згідно з «Інструкції щодо експлуатації».

Проведення безпосередніх вимірювань починають із екстрагування вітамінів із проби, яка аналізується. Для цього наважку проби (премікса) 1,0 г

поміщають у плоскодонну колбу ємністю 50 см³, додають 25 см³ екстрагуючого розчину (див. вище) і ретельно перемішують при кімнатній температурі протягом 15 хв.

Отриманий витяжку переносять у центрифужну пробірку і центрифугують протягом 5 хв зі швидкістю ротора 6000 об/хв. Надосадовий розчин відбирають у чисту пробірку типу «Еппендорф» і вже він аналізується.

На отриманих електрофореграмах необхідно перевірити достовірність автоматичної розмітки піків.

Проведення розрахунків

Масову концентрацію відповідного вітаміну в пробі, яка аналізується, обчислюють за формулою:

$$C_{xi} = \frac{C_{ei} \cdot V_e}{m},$$

де C_{xi} – масова концентрація i -го вітаміну в пробі (г/кг);

C_{ei} – масова концентрація відповідного вітаміну на електрофо-реграмі (мг/дм³);

V_e – об'єм отриманого екстракту (дм³);

m – маса наважки проби, яка аналізується (г).

Лабораторна робота 4.4. Визначення вмісту синтетичних барвників у вині та виноматеріалах методом капілярного електрофорезу.

Принцип методу. Капілярний зональний електрофорез застосовується, як правило, для аналізу малих кількостей досліджуваних речовин, зокрема, забарвлених при використанні фотометричного детектора. Визначення масових концентрацій синтетичних харчових барвників базується на міграції і розділенні іонних форм барвників, які визначаються, під дією зовнішнього

електричного поля внаслідок їх різної електрофоретичної рухливості в умовах, які сприяють пригніченню впливу сторонніх речовин. Ідентифікацію і кількісне визначення аналізуємих барвників, зокрема тартазину (E102), жовтого «сонячний захід» (E110), кармуазину (азорубін) (E122), амаранту (E123), понсо 4R (E124), червоного 2G (E128), червоного чарівного АС (E129) проводять за результатами аналізу спектрів поглинання при довжині хвилі 254 нм.

Матеріал для дослідження: вино, виноматеріали.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: система капілярного електрофорезу з кварцовим капіляром (ефективна довжина менше 50 см, внутрішній діаметр 0,75 мм типу «Капель-105», спектрофотометричним детектором, який працює на довжині хвилі 254 нм, або детектором із робочим інтервалом довжин хвиль у межах 200–300 нм, підтримкою робочої температури капіляру, програмноапаратним комплексом збору даних і обробки електрофореграм; спектрофотометр, який дозволяє вимірювати екстинкцію (оптичну густину) розчинів із діапазоном виміру довжин хвиль від 400 до 700 нм; терези аналітичні 2-го класу точності; шафа сушильна з діапазоном температур у робочій камері від 40 до 200 °С, похибкою ± 1 °С; термометр із діапазоном вимірювання температур від 0 до 100 °С із ціною ділення 1 °С; водяна баня; електроплитка побутова; центрифуга лабораторна зі швидкістю обертання ротора не менше 6000 об/хв; штатив для пробірок; дистильована вода; хлористоводнева кислота (HCl); натрію гіроксид (NaOH); кислота цитринова (лимонна); тетраметилендіамін із вмістом основної речовини не менше 99,5 %; три-лон Б; набір стандартних харчових барвників, які припустимо знаходяться в пробі, що аналізується; ацетонітрил із вмістом основної речовини не менше 99 %; силікагель; піпетки градуйовані ємністю 1 см³, 2,5 і 10 см³; колби мірні ємністю 25 см³, 50 і 100 і 250 см³; склянки хімічні ємністю 25 і 50 см³; бюкси; пробірки центрифужні; пробірки об'ємом 10 см³; пробірки поліетиленові

типу «Еппендорф» об'ємом 1,5 см³; палички скляні; фільтрувальний папір «синя стрічка».

Хід роботи

Перед початком роботи готують ряд розчинів:

1. Приготування розчину натрію гідроксиду масової частки 4 %. У мірну колбу ємністю 100 см³ поміщають 4 г натрію гідроксиду і 50 см³ дистильованої води. Після розчинення реактиву об'єм колби доводять до мітки дистильованою водою. Розчин зберігають в ємкості з поліетилену з сильно загвинченою кришкою.

Термін зберігання розчину – 6 місяців.

2. Приготування розчину хлористоводневої кислоти масової частки 3,5 %. У мірну колбу ємністю 100 см³ поміщають 8,3 см³ хлористоводневої кислоти ($\rho_{\text{HCl}} = 1,18 \text{ г/см}^3$), а потім об'єм колби доводять до мітки дистильованою водою.

Термін зберігання – необмежений.

3. Приготування розчину цитринової кислоти молярної концентрації 0,05 моль/дм³. У хімічну склянку ємністю 25 см³ поміщають 0,24 г безводної цитринової кислоти і додають 15 см³ дистильованої води, ретельно перемішують скляною паличкою до повного розчинення. Потім розчин переносять у мірну колбу (з пришліфованим корком) ємністю 25 см³. Доводять об'єм колби до мітки дистильованою водою, закривають колбу корком і ретельно перемішують.

Термін зберігання розчину в щільно закупореному посуді при кімнатній температурі – 1 місяць.

3. Приготування розчину хлористоводневої кислоти масової частки 1 %. Змішують 3 см³ розчину хлористоводневої кислоти молярної концентрації 6,0 моль/дм³ (див. вище) з 98 см³ дистильованої води і ретельно перемішують. Розчин зберігають у плоскодонній колбі з притертим корком. Термін зберігання необмежений.

4. Приготування розчину тетраметилендіаміну молярної концентрації 0,05 моль/дм³. У хімічну склянку ємністю 25 см³ поміщають 0,145 г тетраметилендіаміну, додають 10 см³ дистильованої води і перемішують скляною паличкою до повного розчинення. Потім розчин переносять у мірну колбу (з пришліфованим корком) ємністю 25 см³, доводять об'єм колби до мітки дистильованою водою, закривають колбу корком і ретельно перемішують.

Термін зберігання розчину в щільно закупореній ємкості при кімнатній температурі – 2 тижня.

5. Приготування розчину трилону Б молярної концентрації 0,05 моль/дм³. У хімічну склянку ємністю 25 см³ поміщають 0,465 г тетраметилендіаміну, додають 15 см³ дистильованої води і перемішують скляною паличкою до повного розчинення. Потім розчин переносять у мірну колбу (з пришліфованим корком) ємністю 25 см³, доводять об'єм до мітки дистильованою водою, закривають її корком і ретельно перемішують.

Термін зберігання розчину при кімнатній температурі – 1 місяць.

6. Приготування буферного розчину. В колбу додають розчин цитринової кислоти (0,05 моль/дм³), розчин тетраметилендіаміну (0,05 моль/дм³), розчин трилону Б і ацетонітрил у співвідношенні (об'ємах) 4:3:1:1. Отриманий розчин центрифугують 4 хв при швидкості обертання ротора 6000 об/хв.. Надосадову рідину поміщають у колбу з притертим корком і щільно закупорюють.

Термін зберігання розчину за нормальних умов – не більше 2 діб.

7. Приготування контрольних зразків синтетичних барвників. У кожну у склянку ємністю 50 см³ поміщають 0,01 г стандартного синтетичного барвника і додають 20 см³ дистильованої води, перемішують скляною паличкою до повного розчинення. Для прискорення процесу розчинення можна нагріти розчин у склянці на водяній бані до температури не більше 90 °С. Потім розчин охолоджують до 20 °С і переносять у мірну

колбу (з пришліфованим корком) ємністю 100 см³, доводять об'єм до мітки дистильованою водою, закривають її корком і ретельно перемішують.

Далі відбирають 10 см³ отриманого розчину стандартного синтетичного барвника і переносять у мірну колбу (з пришліфованим корком) ємністю 100 см³, доводять об'єм у колбі до мітки дистильованою водою, закривають колбу корком і ретельно перемішують.

Цей розчин контрольного зразка синтетичного барвника має масову концентрацію фарбуючої речовини 1 г/дм³. З нього методом розведення дистильованою водою готують інші розчини контрольного зразка з концентрацією 0,50 г/дм³; 0,10; 0,05; 0,01 і 0,005 г/дм³.

Перед початком вимірювання також необхідно підготувати капіляр до роботи. Новий капіляр готують у відповідності до «Інструкції з експлуатації».

Якщо напередодні капіляр залишали заповненим дистильованою водою, то перед початком роботи його промивають 3,5 %-вим розчином хлористоводневої кислоти протягом 5 хв., потім дистильованою водою, 4 %-вим розчином натрію гідроксиду 5 хв., знову дистильованою водою і далі робочим буфером (див. вище) 5 хв. Між аналізами капіляр промивають робочим буфером 2 хв.

Перед початком безпосередніх вимірювань проводиться також градування системи капілярного електрофорезу і контроль стабільності градуювальної характеристики згідно з «Інструкцією щодо експлуатації».

За результатами вимірювань і аналізу електрофореграм контрольних зразків для кожного синтетичного барвника, будується калібрувальний графік, де на вісі абсцис відкладається масова концентрація барвника, а на вісі ординат – величина екстинкції (оптичної густини).

Проби, які аналізуються (зокрема, вина або виноматеріалів), розводять у 10–50 разів дистильованою водою до припустимої в них концентрації синтетичних барвників не більше 0,05 г/дм³, центрифугують 4 хв. при

швидкості обертання ротора центрифуги 6000 об/хв. Отримана надосадова рідина і є пробою, яка аналізується. При порівнянні електрофореграм стандартних синтетичних барвників з електрофореграмами аналізованої проби (це робиться автоматично програмно-аналітичним комплексом, який входить до складу електро-форетичної системи), ідентифікуються синтетичні барвники проби і визначається їх вміст за градуовальним графіком (див. вище).

Проведення розрахунків

Масову концентрацію відповідного синтетичного барвника в пробі, яка аналізується, обчислюють за формулою:

$$C_x = k \cdot C_{град.}$$

де C_x – масова концентрація синтетичного барвника в пробі, яка аналізується (г/дм³);

k – коефіцієнт розведення проби, яка аналізується;

$C_{град.}$ – масова концентрація синтетичного барвника, яка знайдена за градуовальним графіком (г/дм³).

Лабораторна робота 4.5. Визначення вмісту катіонів у воді методом капілярного електрофорезу

Принцип методу. Капілярний зональний електрофорез, як високоефективний метод розділення малих кількостей речовин зі застосуванням відносно простої апаратури, високим ступенем автоматизації, простотою детектування і невеликою витратою реактивів, набув широкого застосування не тільки для розділення біомолекул, але і неорганічних речовин в іонній формі.

Для визначення якості питної води, оцінки ступеня очистки стічних вод виникає потреба визначення в ній ряду водорозчинних сполук, зокрема катіонів амонію, барію, калію, кальцію, літію, магнію, натрію, стронцію. Один із підходів вирішення цієї проблеми – застосування методу капілярного

електрофорезу, за якого в капілярі при дії зовнішнього електричного поля відбувається розділення водорозчинних катіонів неорганічних сполук, за електрофоретичною рухливістю, їх детектування за спектрами поглинання в ультрафіоле-товій області, ідентифікація та визначення масової концентрації.

Матеріал для дослідження: природна і питна вода.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: система капілярного електрофорезу (прилад) з підтримкою робочої температури капіляру, спектрофотометричним детектором, який дозволяє проводити виміри в області довжин хвиль 250–280 нм, оснащена кварцовим капіляром (ефективна довжина не менше 50 см, внутрішній діаметр 0,5 мм) типу «Капель-105» з програмно-апаратним комплексом збору і обробки даних (програмне забезпечення типу «Ельфوران»); терези аналітичні 2-го класу точності; електроплитка; водяна баня; ультразвукова баня; центрифуга лабораторна зі швид-кістю обертання ротора 6000 об/хв; холодильник побутовий; дисти-льована і деіонізована вода; натрію гіроксид; хлористоводнева, винна і нітратна кислоти; бензimidазол, масова частка основної речовини не менше 98 %; Краун-етер 18-Краун-6 (в подальшому 18-Краун-6), масова частка основної речовини не менше 98 % (зберігається в холодильнику при температурі від 2 до 8 °С); стандартні зразки водних розчинів катіонів амонію, барію, калію, кальцію, літію, магнію, натрію і стронцію масової концентрації 1 г/дм³; склянки хімічні; воронки; колби мірні ємністю 25 см³, 50 і 100 см³; колби конічні ємністю 50 і 100 см³; піпетки градуйовані ємністю 1–10 см³; пробірки пластмасові типу «Елпендорф» ємністю 1,5 см³; фільтр мембранний з діаметром пор 0,45 мкм; фільтри паперові «синя стрічка».

Хід роботи

Перед початком роботи готують ряд розчинів:

1. Приготування розчину хлористоводневої кислоти для промивання капіляру. В мірну колбу ємністю 100 см³ вносять 50–60 см³

дистильованої води, додають 8,3 см³ концентрованої хлористоводневої кислоти, ретельно перемішують і доводять об'єм до мітки дистильованою водою.

Термін зберігання – необмежений.

2. Приготування розчину натрію гідроксиду для промивання капіляру. В мірну колбу ємністю 100 см³ вносять 50–60 см³ дистильованої води, додають 2 г натрію гідроксиду, ретельно перемішують до розчинення і доводять об'єм до мітки дистильованою водою.

Термін зберігання в закритій корком ємкості з полімерного матеріалу – не більше 6 місяців.

3. Приготування розчину бензimidазолу молярної концен-трації 0,04 моль/дм³. У мірну колбу ємністю 100 см³ вносять 50–60 см³ дистильованої води, додають 0,472 г бензimidазолу, ретельно перемішують і витримують на киплячій водяній бані до повного розчинення. Після охолодження до кімнатної температури доводять об'єм до мітки дистильованою водою.

Термін зберігання при кімнатній температурі – не більше 3 місяців. При температурі зберігання нижче 20 °С можливе випадання бензimidазолу в осад. У цьому випадку перед використанням розчин необхідно підігріти на водяній бані до повного розчинення осаду, а після цього охолодити до кімнатної температури.

4. Приготування розчину винної кислоти молярної концен-трації 0,02 моль/дм³. У мірну колбу ємністю 25 см³ вносять 15 см³ дистильованої води, додають 75 мг безводної винної кислоти, ретельно перемішують до розчинення, доводять об'єм до мітки дистильованою водою і знову перемішують.

Термін зберігання розчину при температурі від 2 до 8 °С – не більше 1 місяця.

5. Приготування розчину 18-Краун-6 молярної концентрації 0,01 моль/дм³. У мірну колбу ємністю 50 см³ вносять 25 см³ дистильованої

води, додають 0,132 г 18-Краун-6, ретельно перемішують і доводять об'єм до мітки.

Термін зберігання розчину в ємкості з полімерного матеріалу при температурі від 2 до 8 °С – не більше 6 місяців.

6. Приготування електроліту. В сухій ємкості з поліакриламідного матеріалу змішують розчин бензimidазолу (0,04 моль/дм³), розчин винної кислоти (0,02 моль/дм³), розчин 18-Краун-6 (0,01 моль/дм³) і дистильовану воду в співвідношенні 5:2:2:1 ретельно перемішують і фільтрують через мембранний фільтр із діаметром пор 0,45 мкм у суху ємкість, яка загвинчується кришкою.

Приготовлений розчин електроліту містить 0,02 моль/дм³ бензimidазолу, 0,04 моль/дм³ винної кислоти і 0,02 моль/дм³ 18-Краун-6.

Розчин електроліту готують в об'ємі, який необхідний і достатній для проведення вимірів протягом однієї робочої доби.

Безпосередньо перед проведенням вимірів розчин електроліту дегазують центрифугуванням протягом 5 хв при швидкості обертання ротора 6000 об/хв або обробкою ультразвуком в ультразвуковій бані протягом 5 хв.

7. Приготування вихідного розчину суміші літію і барію. В мірну колбу ємністю 25 см³ вносять 1 см³ стандартного водного розчину катіону літію і 2,5 см³ такого розчину барію з номінальним значенням масової концентрації кожного з них 1 г/дм³, доводять об'єм до мітки дистильованою водою і ретельно перемішують. Номінальне значення масової концентрації катіонів літію складає 40 мг/дм³, а барію – 100 мг/дм³.

Термін зберігання розчину в ємкості з полімерного матеріалу при температурі від 2 до 8 °С – не більше 3 місяців.

7. Приготування градуювальних розчинів суміші катіонів. Для градуювання системи капілярного електрофорезу (приладу) вико-ристовують градуювальні розчини, які наведені в Таблиці 4.3.

Залежно від передбачуваного складу проби води, яка аналізується, допускається виключення складу градуювальних сумішей окремих катіонів, зменшення їх числа до чотирьох, але приготування градуювальних сумішей № 1 є обов'язковим.

Для приготування градуювальних сумішей, які наведені в табл. 4.3, рекомендовано спочатку підготувати градуювальний розчин № 6: у мірну колбу ємністю 100 см³ вносять піпеткою по 5 см³ стандартні зразки водних розчинів катіонів амонію, калію, кальцію, натрію, стронцію і 2,5 см³ стандарту розчину катіонів магнію масової концентрації кожного з них 1 г/дм³ і 5 см³ вихідного розчину суміші катіонів літію і барію (див. вище); об'єм у колбі доводять до мітки дистильованою водою.

Таблиця 4.3. Градуювальні розчини

Катіон	Номінальні значення масової концентрації катіонів в градуювальних розчинах катіонів (у суміші), мг/дм ³					
	Номер розчину					
	1	2	3	4	5	6
Амоній	0,50	2,00	5,0	10,0	20,0	50,0
Калій	0,50	2,00	5,0	10,0	20,0	50,0
Натрій	0,50	2,00	5,0	10,0	20,0	50,0
Літій	0,02	0,08	0,2	0,4	0,8	2,0
Магній	0,25	1,00	2,5	5,0	10,0	25,0
Стронцій	0,50	1,00	5,0	10,0	20,0	50,0
Барій	0,05	0,20	0,5	1,0	2,0	5,0
Кальцій	0,50	2,00	5,0	10,0	20,0	50,0

Для приготування градуювальних розчинів № 1–5 у п'ять мірних колб ємністю 50 см³ вносять, відповідно, 0,5 см³; 2,0; 5,0; 10,0 і 20,0 см³

градувального розчину № 6 і доводять об'єм у колбі до мітки дистильованою водою.

Термін зберігання градувальних розчинів суміші катіонів у щільно закритих ємкостях із полімерних матеріалів при температурі від 2 до 8 °С складає: № 1 і 2 – не більше 7 діб, № 3–5 – не більше 23 діб, № 6 – не більше 3 місяців.

Перед початком вимірювання також необхідно підготувати капіляр до роботи. Новий капіляр готують у відповідності до «Інструкції щодо експлуатації».

Після щодобової роботи, якщо капіляр залишали заповненим дистильованою водою, його промивають розчином натрію гідроксиду (див. вище) 5 хв, (див. вище) 10 хв. При заданій робочій напрузі (від 10 до 25 кВ, рекомендується 13 кВ) капіляр знову промивають електролітом 5 хв.

Між вимірами після реєстрації кожної електрофореграми капіляр промивають електролітом протягом 2 хв. Після завершення вимірювань капіляр промивають дистильованою водою.

Проводиться також перед початком безпосередніх вимірювань градування системи капілярного електрофорезу і контроль стабільності градувальної характеристики згідно з «Інструкцією щодо експлуатації».

За результатами вимірювань і аналізу електрофореграм градувальних розчинів суміші катіонів будують калібрувальні графіки для кожного катіону, де по вісі абсцис відкладають площу піків на електрофореграмі від катіонів, які аналізуються, а на вісі ординат – масову концентрацію катіону. Ці калібрувальні графіки використовуються для визначення вмісту катіонів у пробі води, яка аналізується. Ідентифікацію цих катіонів проводять при співставленні електрофореграм проби, яка аналізується, з такими для градувальних розчинів.

Проби води для аналізу відбирають об'ємом не менше 100 см³ в ємкості з борсилікатного скла або з полімерного матеріалу. Аналіз проводять як

можна скоріше після відбору. Якщо аналіз проби води проводять пізніше, ніж через 6 год після відбору, то пробу зберігають при температурі від 2 до 8 °С, при чому термін зберігання проби не більше 24 год.

Пробу аналізуємої води об'ємом не менше 100 см³ фільтрують через фільтрувальний папір «синя стрічка» в суху ємкість, при цьому відкидають перші 25 см³ фільтрату.

Якщо в пробі води, яка аналізується, припускається наявність великої кількості компонентів, що характерно для неочищеної, сильно мінералізованої води, вилучення іонів амонію проводять за допомогою відгонки.

Відфільтровану або (за необхідності) відігнану воду дегазують центрифугуванням протягом 5 хв. при швидкості обертання ротора 6000 об/хв або обробкою ультразвуком в ультразвуковій бані протягом 10 хв.

У подальшому дегазовану пробу аналізують (проводять електрофорез) при тих же умовах, що і градууювальні розчини.

Проведення розрахунків

За використання програмно-аналітичного комплексу, який входить до складу електрофорезу, автоматично ідентифікують катіони, що визначаються, перевіряють правильність розмітки піків на електрофореграмі (за необхідності вносять корективи), а також визначають пощу піків, які відповідають ідентифікованим катіонам. Ця площа пропорційна масовій концентрації катіону в зразках, які аналізуються. Порівнюють площі піків однакових катіонів на електрофореграмах градууювального розчину, який використаний для побудови калібрувального графіка, і аналізуємої проби.

За цим графіком визначається масова концентрація конкретного катіону в пробі. У випадку, коли площі піків електрофореграми проби, яка аналізується, виходять за верхню межу діапазону градууювального графіку, то пробу розводять деіонізованою водою, реєструють об'єм розведеної проби (V_k) і об'єм аліквоти аналізуємої проби, взятий для розведення (V_a):

У цьому випадку масову концентрацію конкретного катіону в пробі води, яка аналізується, обчислюють за формулою:

$$C_x = C \cdot \frac{V_k}{V_a},$$

де C_x – масова концентрація катіону в пробі води, яка аналізується (мг/дм³);

C – масова концентрація катіону, яка знайдена за калібрувальним графіком у розведеній пробі води, яка аналізується (см³);

V_k – об'єм розведеної проби води, яка взята для аналізу (см³);

V_a – об'єм аліквоти аналізованої проби, який взятий для розведення (см³).

5. ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ОРГАНІЗМІВ

Імунологія (лат. *immunis* – незайманий, вільний від чогось та грецьк. *logos* – поняття, вчення, думка, розум) – галузь науки, яка вивчає захисні реакції організмів, в тому числі від *ксенобіотиків* (грецьк. *xenos* – чужорідний), до яких відносяться токсичні забруднювачі довкілля, харчових продуктів для людей і кормів для сільськогосподарських тварин, питної води. Саме вони є *антигенами* (грецьк. *anti* – приставка, яка означає протилежність та *genos* – походження, рід; народжений), тобто речовинами, які здатні викликати імунну відповідь, а саме продукування організмами білкової природи *антитіл*, які здатні нейтралізувати дію антигенів.

Методами імунологічного аналізу, яких існує ціла низка (радіоімунний, конкуретний, «сендвич»-метод, рідинний, твердофазний, імунохроматографічний, імунолюмінесцентний, імуноелектрофоретичний, імуноферментний та ін.) можна визначати не тільки токсичні речовини, але і генетично модифіковані (ГМ) компоненти харчових продуктів, які можуть зустрічатися в хлібобулочних, м'ясних і молочних виробках, овочевих

продуктах, кондитерських виробках, харчових концентратах (зокрема, кашах та супах швидкого приготування) та інше.

Найбільш поширеним, високочутливим і специфічним методом аналізу досліджуваного матеріалу на вміст ГМ організмів (ГМО) або їхніх інгредієнтів є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який дозволяє визначити будь-яку частину привнесеної генетичної конструкції.

У загальному вигляді порядок проведення аналізу досліджуваного матеріалу на ГМО можна представити наступним чином:

гомогенізація досліджуваного матеріалу → екстракція ДНК → детекція обраного фрагменту ДНК → візуалізація результатів та їхня інтерпретація.

Для проведення ПЛР необхідні такі основні компоненти:

1. ДНК-мішень (ДНК-матриця) – частина ДНК, яка містить вбудований генетичний матеріал (вибрані фрагменти ДНК).
2. Праймери (англ. *primaries* – первинний, першопочатковий), які становлять собою відрізки ланцюга ДНК з 20–30 нуклеотидів, які необхідно в подальшому *ампліфікувати* (лат. *amplification* – розповсюдження, збільшення).
3. Фермент ДНК-полімераза, яка синтезує комплементарний ланцюг ДНК (добудову праймерів).
4. Необхідні для протікання ПЛР речовини: іони Mg^{2+} , суміш дезоксирибонуклеотидфосфатів, середовище (буфер) для забезпечення оптимальних умов функціонування ДНК-полімерази тощо.

Лабораторна робота 5.1. Виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) з рослинної сировини

Принцип методу. Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) – це полінуклеотид, мономерними одиницями якого є 4 дезоксирибо-

нуклеотидфосфати (дАМФ, дГМФ, дЦМФ і дТМФ), що сполучні між собою 3',5' – фосфодиетерним зв'язком.

Окремі ділянки (фрагменти) ДНК відповідають певним генам, які є одиницями спадкової інформації і містять відомості про первинну структуру матричної рибонуклеїнової кислоти (РНК) або продукт її трансляції – одного білка чи поліпептидного ланцюга. Цей полінуклід точно відтворюється при поділі клітин, що забезпечує наступним поколінням клітин і організму в цілому передачу спадкових ознак.

Метод виділення ДНК з рослинної сировини, який застосовується в даній роботі, ґрунтується на сорбції (поглинанні) ДНК кремнію діоксидом (SiO_2).

Матеріал для дослідження: рослинна сировина, зокрема боби сої або зерно кукурудзи.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: настільний бокс з УФ-лампю; спектрофотометр; терези аналітичні 2-го класу точності з найбільшою межою зважування 200 г; гомогенізатор або млинок; термостат з регульованою температурою; апарат для струшування типу «Вортекс» з частотою обертів від 250 до 3 000 об./хв.; мікроцентрифуга з частотою обертання ротору не менше 13 000 об./хв.; секундомір; холодильник з температурою $2-8^{\circ}\text{C}$ і морозильною камерою -20°C ; вакуумний насос з колбою-уловлювачем; набір автоматичних дозаторів змінного об'єму; одноразові наконечники з аерозольним бар'єром; одноразові поліпропіленові пробірки місткістю $1,5\text{ см}^3$ з кришками типу «Еппендорф»; колба місткістю 250 см^3 ; пробірки скляні місткістю 10 см^3 і штатив для них; скляні палички; високоочищений (стандартний) препарат ДНК; протеїназа К (розчин з масою концентрацією 20 мкг/мм^3); протеїназний буфер (натрію хлорид – $5,84\text{ г}$; 1 моль/дм^3 Трис-НСІ (рН 8,0) – 50 см^3 ; $0,5\text{ моль/дм}^3$ ЕДТА (рН 8,0) – 50 см^3 ; деонізована вода – доводять об'єм до 200 см^3); лізуючий розчин (гуанідинтіоціонат – 120 г ; $0,1\text{ моль/дм}^3$ Трис-НСІ (рН 6,4) – 100 см^3 ;

0,2 моль/дм³ ЕДТА (рН 8,0) – 22 см³; тритон Х-100 – 2,6 г); сорбент ДНК кремнію діоксид (SiO₂) – 60 г; дистильована вода – 30 см³); розчин для відмивання 1 (гуанідинтіоціонат – 120 г; 0,1 моль/дм³ Трис-НСІ (рН 6,4) – 100 см³; розчин для відмивання 2 (70%-й етанол); буфер для елюції, ТЕ-буфер (10 моль/дм³ Трис-НСІ (рН 8,0) – 10 см³; 1 моль/дм³ МЕДТА (рН 8,0) – 10 см³); 0,5 н.; розчин хлорної кислоти (НСІО₄; – по 10 см³).

Хід роботи

Пробу, яка аналізується (зокрема зерно), подрібнюють за допомогою гомогенізатора або млинка.

До пробірки зі зразком масою 250 г додають по 2 см³ протеїназного буферу і 4 мм³ протеїнази К з масовою концентрацією 20 мкг/мм³. Проби ретельно перемішують та інкубують 2 год при 60⁰С і постійно перемішують. Після цього пробу відстоюють 15 хв при кімнатній температурі.

В подальшому відбирають 100 мм³ середньої фази супернатанта в поліпропіленову пробірку типу «Еппендорф», додають 300 мм³ лізуючого розчину і 25 мм³ розчину сорбенту (SiO₂) ДНК. Суміш ретельно перемішують на апараті для струшування типу «Вортекс» з перервою 1 хв. протягом 10 хв. і потім центрифугують 2 хв при частоті обертання ротора 1 500 об./хв.

За допомогою вакуумного насосу з колбою поглиначем вилучають після центрифугування супернатант, не торкаючись сорбенту. До цього супернатанту додають 300 мм³ розчину для відмивання 1, центрифугують 30 с при 5 000 об./хв.

Потім таким же чином знову вилучають супернатант за допомогою вакуумної колби-уловлювача не торкаючись сорбента, додають до нього 500 мм³ розчину для відмивання 2, ретельно перемішують на апараті типу «Вортекс» і знову центрифугують 30 с при 10 000 об./хв.

У подальшому осад підсушують в термостаті при температурі 30 ⁰С протягом 5–6 хв, при цьому кришки пробірок типу «Еппендорф» повинні бути відкритими. До цього підсушеного осаду додають 50 мм³ буферу для елюції

(TE-буферу). Ретельно перемішують на апараті типу «Вортекс» до повного ресуспендування, інкубують в термостаті при температурі 60°C 5 хв періодично перемішуючи, а потім центрифугують 10 хв при 13 000 об./хв. і переносять 45 мм³ супернатанту в пробірку типу «Еппендорф».

Цей супернатант містить очищену ДНК, яку можна досліджувати як свіжовиділену так і розморожену після заморозки при температурі не вище – 20°C.

Концентрацію ДНК в даному розчині визначають спектрофотометрично при вимірі екстинції (оптичної густини) за довжини хвилі 260 нм і оцінюють по відношенню до стандартних розчинів ДНК по калібрувальному графіку (по вісі ординат відкладають значення величини екстинції, а абсцис – концентрацію ДНК).

Існують також інші методичні підходи визначення концентрації ДНК. Один з них – метод визначення нуклеїнових кислот по Спірину, який ґрунтується на кислотному їх гідрозділі хлорною кислотою (HClO₄) до розчинних фрагментів і визначення в них вмісту нуклеїнового фосфору, кількість якого перераховують на кількість ДНК. Для цього здрібнену пробу поміщають в центрифужну пробірку з 5 – 10 см³ охолодженого до 10°C 0,2 н розчину хлорної кислоти. Вміст пробірки ретельно перемішують, дають відстоятися 10 хв. на холоді і осад відділяють на холоді центрифугуванням при 3 000 об./хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину відбирають, а осад повторно відмивають хлорною кислотою. Така попередня обробка проби необхідна для видалення кислорозчинних нуклеотидів.

Після відділення надосадової рідини вдруге осад нагрівають в киплячій водяній бані (закриваючи пробірку корком з повітряним холодильником) протягом 30 хв в присутності 5–10 см³ (в залежності від очікуваного вмісту нуклеїнової кислоти) 0,5 н розчину хлорної кислоти. Це забезпечує екстракцію нуклеїнових кислот з проби та їх кислотний гідроліз до розчинених фрагментів. Гідролізат охолоджують і центрифугують при 3 000

об./хв 10 хв. Його надосадову рідину відбирають для подальшого дослідження, а з осаду повторно отримують гідролізат (фрагменти) нуклеїнових кислот. Отримані гідролізати об'єднують і в подальшому спектрофотометрують при довжині хвилі 270 нм і 290 нм для визначення вмісту фосфора у ДНК, а вже його перераховують на вміст цієї нуклеїнової кислоти в пробі.

Кількість нуклеїнового фосфору в гідролізаті проби, яка аналізується, обчислюють за формулою:

$$C_{\phi} = \frac{E_{270} - E_{290}}{0,19},$$

де C_{ϕ} – масова концентрація нуклеїнового фосфору в гідролізаті проби, яка аналізується (мкг/см³);

E_{270} і E_{290} – екстинції розчину гідролізату проби при 270 нм і 290 нм, відповідно;

0,19 – значення екстинції ΔE ($E_{270} - E_{290}$), яке має гідролізат нуклеїнових кислот, що містить 1 мкг нуклеїнового фосфору.

При подальших розрахунках визначається загальний об'єм гідролізату і ступінь розведення. Для перерахунку кількості нуклеїнового фосфору на кількість нуклеїнової кислоти використовують коефіцієнт перерахунку, який для ДНК дорівнює 10,1:

$$C_{\text{ДНК}} = C_{\phi} \cdot 10,1,$$

де $C_{\text{ДНК}}$ і C_{ϕ} – кількість ДНК і нуклеїнового фосфору, відповідно, в пробі, яка аналізується (мкг/см³).

Лабораторна робота 5.2. Проведення якісного визначення ГМО методом ПЛР у реальному часі (скринінг регуляторів експресії)

Принцип методу. Для скринінгу ГМО проводиться визначення таких регуляторних елементів експресії привнесених генів як 35S-промотор вірусу

мозаїки цвітної капусти, *nos*-термінатор з *Agrobacterium tumefaciens* та промотор вірусу мозаїки ранника (pFMV), які містяться у більшості відомих сьогодні ГМ-рослин. Окрім того для контролю виділення ДНК для кожної рослини використовується детекція ділянки специфічного ендogenousного гену. Так для сої в якості ендogenousного контролю найчастіше використовують ген, що кодує лектин (*lec*), для кукурудзи ген, який кодує фермент алкогольдегідрогеназу (*adh*).

Матеріал для дослідження: зразки ДНК бобів чи листя сої або ДНК виділена із інших ГМ рослин, які аналізуються на можливість наявності модифікованого генетичного матеріалу (експериментальні зразки); контрольні зразки ДНК цих рослин, які не містять привнесеного гену.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: система ПЛР у реальному часі (ампліфікатори AVi Prism 7 000 (Applied Biosystems), Rotor-Gene (Corbett Research), Q-Cycler (Bio-Rad) CFX 96 (Bio-Rad) або подібні; ПЛР-бокс з УФ-лампкою; апарат для струшування типу «Вортекс» з частотою обертів від 250 до 3 000 об./хв.; секундомір; холодильник з температурою 2–8⁰С і морозильною камерою –20⁰С; лабораторна центрифуга з частотою обертів ротора 5 000 об./хв.; набір автоматичних дозаторів змінного об'єму; одноразові наконечники з аерозольним бар'єром; мікропробірки об'ємом 0,2 см³; оптичні 8-ми лункові стріпи, або 96-лунковий планшет, 96-ти лункова термopідставка для мікропробірок; одноразові поліпропіленові пробірки місткістю 1,5 см³ типу «Еппендорф».

Набір реагентів для детекції 35S-промотору, *nos*-термінатору та відповідного ендogenousного контролю:

1. Пробірка з ПЛР-сумішшю (ПЛР-буфер (без MgCl₂); розчин MgCl₂ молярної концентрації 2,5 ммоль/дм³; суміш дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (дНТФ), що містить дАТФ, дЦТФ, дГТФ дТТФ молярної концентрації 1,5 ммоль/дм³ кожного; по 5 пмоль/дм³ праймерів для детекції 35S-промотору, *nos*-термінатору та відповідного ендogenousного контролю, по 2,5 пмоль/дм³

флуоресцентного зонду для детекції 35S-промотору, *nos*-термінатора та відповідного ендогенного контролю; деіонізована вода. Для флуоресцентних зондів використовують різні флуоресцентні барвники, однак найчастіше це FAM (6-карбоксіфлуоресціїн), ROX (карбоксі-Х-родамін), JOE (6-карбоксі-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеїн) TAMRA (6-карбоксі-тетраметил-родамін). Нуклеотидні послідовності для детекції 35S-промотору, *nos*-термінатора та ендогенних генів наведені в національних стандартах ДСТУ ISO 21569:2008 і ДСТУ ISO 21570:2008.

2. Таг ДНК-полімераза, питомою активністю 1 Е/мм³ (16,64 катал/мм³);
3. Урацил-ДНК-глікозилаз питомою активністю 0,2 Е/мм³ (3,33 катал/мм³).

Хід роботи

Перед початком безпосереднього аналізу готують (або розморожують) ПЛР-суміш, яка на одну пробу містить ПЛР-буфер (склад залежить від конкретної системи ПЛР і поставлених задач та надається у пропису до ПЛР-реакції). Якщо ПЛР-суміш розморожують, то після цього її ретельно перемішують на апараті типу «Вортекс» і осаджують центрифугуванням при 5 000 об./хв. протягом 5с.

Готують реакційну суміш для досліджуваних зразків з розрахунку 22,5 мм³ ПЛР-суміші, 0,2 мм³ розчину Таг ДНК-полімерази і 0,1 мм³ урацил-ДНК-глікозилази на один зразок. Приготовлену суміш ретельно перемішують на апараті «вортекс» і прикривають оптичними кришками.

Відібрають необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 см³, стрипів або 96-луночний планшет, додають в кожну лунку по 22,5 мм³ отриманої ПЛР-реакційної суміші і по 2,5 мм³ зразків ДНК, які аналізуються.

Для попередження отримання хибнопозитивних та хибнонегативних результатів дослідження за проведення ПЛР у реальному часі використовують наступні контролю:

- 1) позитивний;

- 2) негативний;
- 3) контроль без матриці (NTC, no templatecontrol);
- 4) негативний контроль виділення (НКВ).

У лунки, які призначені для позитивного і негативного контролю вносять по 2,5 мм³, відповідно, реактиву «Позитивний контроль» і «Негативний контроль» (надаються для контролю правильності проведення ПЛР у реальному часі), для NTC контролю – 2,5 мм³ деіонізованої води, а для НКВ контролю – 2,5 мм³ екстракту НКВ, який отриманий при виділенні ДНК.

Дослідження проводять згідно «Інструкції по експлуатації» та існуючим правилам експлуатації конкретної системи ПЛР у реальному часі. Температурний профіль ампліфікації задають згідно наведених даних (табл.5.1).

Таблиця 5.1. – Температурний протокол ампліфікації

Стадія	Режим ампліфікації		Процес	Кількість циклів
	Температура, °C	Час, хв.		
1	50	2,0	Активація урацил–ДНК–глікозилази	1
2	94	9,0	Активація полімерази	1
3	95	0,2	Денатурація ДНК	40
	60	1,0	Відпалювання праймерів*	
	72	0,3	Елонгація ланцюга ДНК	

Примітка: * – стадія, на якій здійснюється збір даних флуоресценції

Для інтерпретації результатів якісного визначення вмісту ГМО проводять аналіз кривих ампліфікації досліджуваних зразків та контролю (рис. 5.1).

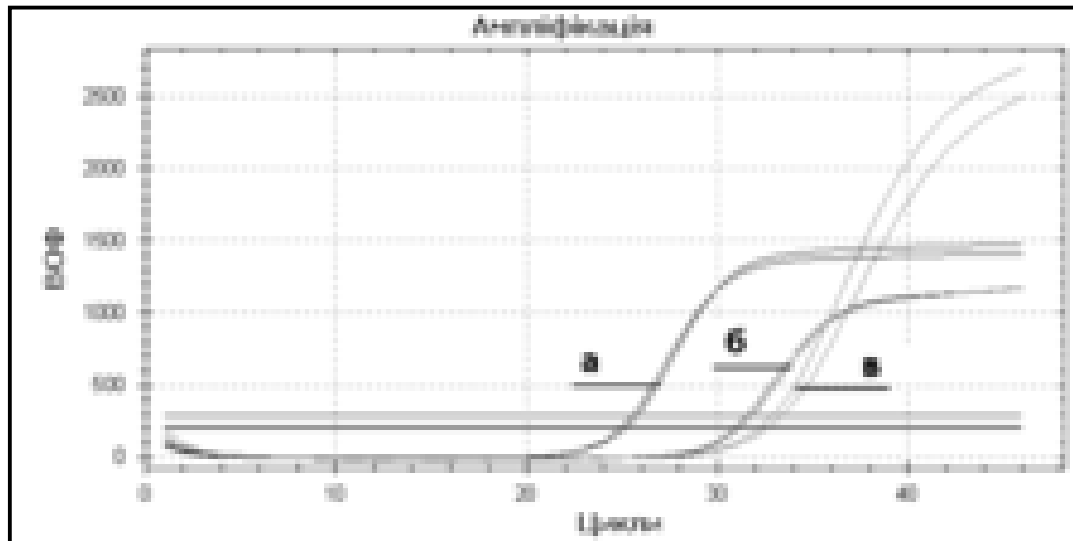


Рис. 5.1. Приклад позитивного зразка сої:

а – ендogenous контроль (лектин сої), б – 35S-промотор, в – *nos*-термінатор, ВОНФ – відносні одиниці флуоресценції.

1. Зразок вважається позитивним, якщо спостерігається ампліфікація за флуоресцентними барвниками FAM(35S-промотор) і/або ROX (*nos*-термінатор) та JOE (ендогенний контроль)

2. Зразок вважається негативним, якщо присутня ампліфікація тільки ендogenous контролю (барвник JOE) зі значенням C_t (пороговий цикл, що характеризує певний цикл ПЛР у реальному часі, за якого флуоресцентний сигнал перевищує визначене базове значення, настає так звана область репортерної флуоресценції), яке характерне для певної рослини, наприклад для сої 23–24, кукурудзи – 24,5–25,5 (рис. 5.2).

3. У позитивного контролю повинна відбуватися ампліфікація за барвниками FAM(35S-промотор) і/або ROX (*nos*-термінатор) та JOE (ендогенний контроль);

4. У негативного контролю повинна відбуватися ампліфікація тільки за барвником JOE (ендогенний контроль);

5. У контролях NTC і НКВ не повинна відбуватися ампліфікація за жодним з барвників.

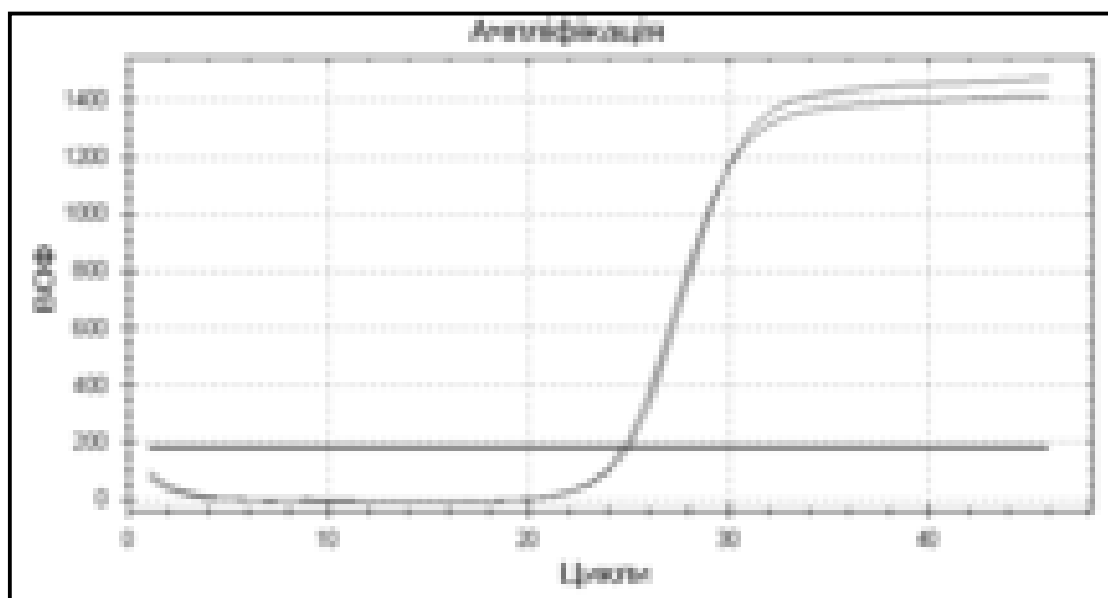


Рис. 5.2. Приклад негативного зразка сої (відбувається ампліфікація тільки ендogenousного контролю): ВОФ – відносні одиниці флуоресценції.

Результати аналізу не враховують:

1. При відсутності ампліфікації забарвником JOE у зразка, що випробується;
2. При відсутності ампліфікації за барвником FAM або JOE у позитивного контролю;
3. При наявності ампліфікації за барвником FAM у негативного контролю;
4. За наявності ампліфікації за барвником FAM або JOE у NTC і/або НКВ контролях;
5. За великої розбіжності значення S_{tu} паралельних вимірювань ($SD > 0,5$).

6. Аналогічні підходи існують і для якісного визначення інших трансгенних послідовностей привнесених в рослину, наприклад промотор вірусу мозаїки ранника (pFMV) гени PAT, BAR, EPSPs.

Лабораторна робота 5.3. Ідентифікація ГМ-лінії сої GTS 40-3-2 методом ПЛР у реальному часі

Принцип методу. Для ідентифікації ГМ-ліній рослин проводиться детекція специфічної трансформаційної події яка властива тільки цій ГМ-лінії. Окрім того для контролю виділення ДНК для кожної рослини використовується детекція ділянки специфічного ендогенного гену. Так для сої в якості ендогенного контролю найчастіше використовують ген, що кодує лектин (Lec), для кукурудзи ген, який кодує фермент алкогольдегідрогеназу (adh).

Матеріал для дослідження: зразки ДНК бобів сої ГМ-лінії GTS 40-3-2, яка володіє стійкістю до гербіциду RoundUp®, контрольні зразки ДНК сої тридиційної селекції.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: система ПЛР у реальному часі (ампліфікатори ABi Prism 7 000 (AppliedBiosystems), Rotor-Gene (CorbettResearch), Q-Cycler (Bio-Rad) CFX 96 (Bio-Rad) або подібні; ПЛР-бокс з УФ-лампкою; апарат для струшування типу «Вортекс» з частотою обертів від 250 до 3 000 об./хв; секундомір; холодильник з температурою 2–8 °С і морозильною камерою – 20°C; лабораторна центрифуга з частотою обертів ротора 5 000 об./хв; набір автоматичних дозаторів змінного об'єму; одноразові наконечники з аерозольним бар'єром; мікропробірки, які піходять до проведення ПЛР в реальному часі об'ємом 0,2 см³; оптичні 8-ми лункові стріпи, або 96-лунковий планшет, 96-ти лункова термopідставка для мікропробірок; одноразові поліпропіленові пробірки місткістю 1,5 см³ типу

«Еппендорф». Набір реагентів для детекції ГМ-лінії сої *GTS 40-3-2* та відповідного ендогенного контролю:

Пробірка з ПЛР-сумішшю (ПЛР-буфер (без $MgCl_2$); розчин $MgCl_2$ молярної концентрації $2,5 \text{ ммоль/дм}^3$; суміш дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (дНТФ), що містить дАТФ, дЦТФ, дГТФ дТТФ молярної концентрації $1,5 \text{ ммоль/дм}^3$ кожного; по 5 пмоль/дм^3 праймерів для детекції *GTS 40-3-2* та відповідного ендогенного контролю, по $2,5 \text{ пмоль/дм}^3$ флуоресцентного зонду для детекції *GTS 40-3-2* та ендогенного гену (лектин); деіонізована вода. Для флуоресцентних зондів використовують різні флуоресцентні барвники, однак найчастіше це FAM (6-карбоксіфлуоресціїн), ROX (карбоксі-Х-родамін), JOE (6-карбоксі-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеїн) TAMRA (6-карбокситетраметил-родамін). Нуклеотидні послідовності для детекції ГМ лінії сої *GTS 40-3-2* та ендогенного гену (лектин), а також інших трансформаційних подій наведено в національних стандартах ДСТУ ISO 21569:2008 і ДСТУ ISO 21570:2008.

Таг ДНК–полімераза, питомою активністю 1 Е/мм^3 ($16,64 \text{ катал/мм}^3$);
Урацил–ДНК–глікозилаз питомою активністю $0,2 \text{ Е/мм}^3$ ($3,33 \text{ катал/мм}^3$).

Хід роботи

Перед початком безпосереднього аналізу готують (або розморожують) ПЛР–суміш, яка на одну пробу містить ПЛР–буфер (склад залежить від конкретної системи ПЛР і поставлених задач та надається у пропису до ПЛР–реакції). Якщо ПЛР–суміш розморожують, то після цього її ретельно перемішують на апараті типу «Вортекс» і осаджують краплини центрифугуванням при $5\,000 \text{ об./хв}$ протягом 5 с .

Готують реакційну суміш для досліджуваних зразків з розрахунку $22,5 \text{ мм}^3$ ПЛР–суміші, $0,2 \text{ мм}^3$ розчину Таг ДНК–полімерази і $0,1 \text{ мм}^3$ урацил–ДНК–глікозилази на один зразок. Приготовлену суміш ретельно перемішують на апараті «вортекс» і прикривають оптичними кришками.

Відібрають необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 см³, стрипів або 96-луночний планшет, додають в кожен лунку по 22,5 мм³ отриманої ПЛР-реакційної суміші і по 2,5 мм³ зразків ДНК, які аналізуються.

Для попередження хибнопозитивних та хибнонегативних результатів за проведення ПЛР у реальному часі використовують наступні контролю:

- а) позитивний;
- б) негативний;
- в) контроль без матриці (NTC, no templatecontrol);
- г) негативний контроль виділення (НКВ).

У лунки, які призначені для позитивного і негативного контролю вносять по 2,5 мм³, відповідно, реактиву «Позитивний контроль» і «Негативний контроль» (надаються для контролю правильності проведення ПЛР у реальному часі), для NTC контролю – 2,5 мм³ деіонізованої води, а для НКВ контролю – 2,5 мм³ екстракту НКВ, який отриманий при виділенні ДНК.

Дослідження проводять згідно «Інструкції по експлуатації» та існуючим правилам експлуатації конкретної системи ПЛР у реальному часі. Температурний профіль ампліфікації задають згідно даних (табл. 5.2).

Таблиця 5.2. – Температурний протокол ампліфікації

Стадія	Режим ампліфікації		Процес	Кількість циклів
	Температура, °C	Час, хв.		
1	50	2,0	Активація урацил-ДНК-глікозилази	1
2	94	9,0	Активація полімерази	1
3	95	0,2	Денатурація ДНК	40
	60	1,0	Відпалювання праймерів*	
	72	0,3	Елонгація ланцюга ДНК	

Примітка: * – стадія, на якій здійснюється збір даних флуоресценції

Для інтерпретації результатів ідентифікації ГМ-лінії сої *GTS 40-3-2* проводять аналіз кривих ампліфікації досліджуваних зразків та контролів:

6. Зразок вважається позитивним, якщо спостерігається ампліфікація за флуоресцентними барвиками FAM (*GTS 40-3-2*) та JOE (ендогенний контроль) (рис. 5.3).

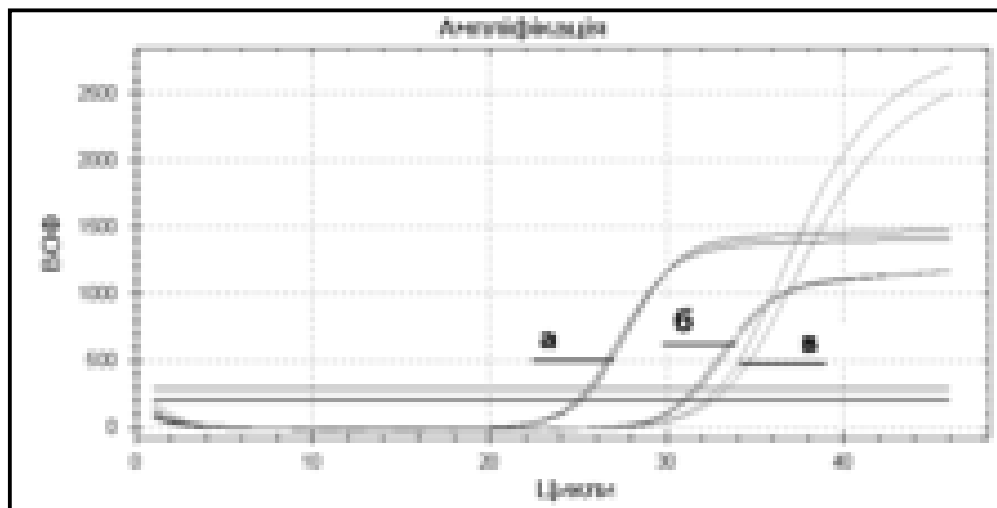


Рис. 5.3. Приклад позитивного зразка ГМ-лінії сої *GTS 40-3-2*:

а – ендogenous контроль (лектин сої); б – *GTS 40-3-2*; ВОФ – відносні одиниці флуоресценції.

7. Зразок вважається негативним, якщо присутня ампліфікація тільки ендogenous контролю (барвник JOE) зі значенням C_t (пороговий цикл, що характеризує певний цикл ПЛР у реальному часі, за якого флуоресцентний сигнал перевищує визначене базове значення, настає так звана область репортерної флуоресценції), яке характерне для певної рослини, наприклад для сої 23–24, кукурудзи – 24,5–25,5 (рис. 5.4).

8. У позитивного контролю повинна відбуватися ампліфікація за барвниками FAM (*GTS 40-3-2*) та JOE (ендогенний контроль);

9. У негативного контролю повинна відбуватися ампліфікація тільки за барвником JOE (ендогенний контроль);

10. У контролях NTC і НКВ не повинна відбуватися ампліфікація за жодним з барвників.

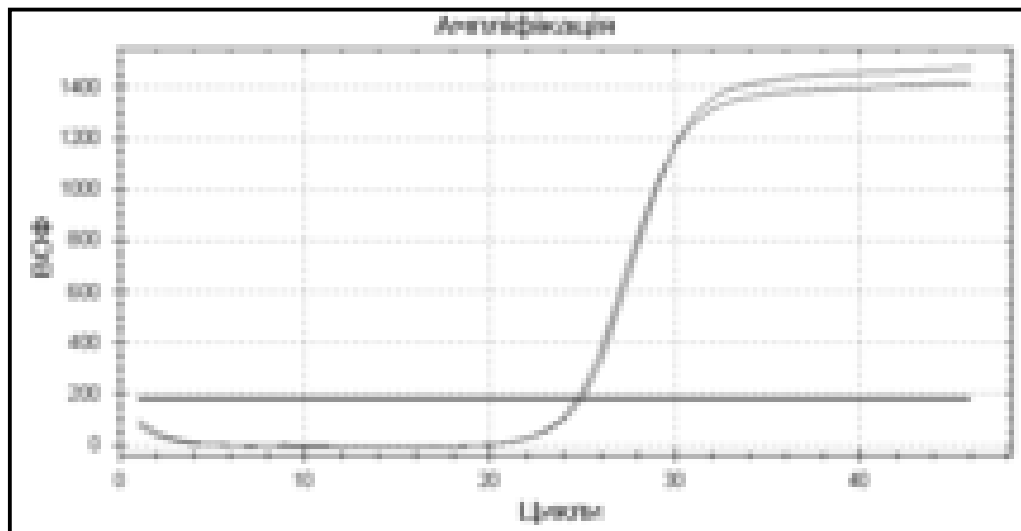


Рис. 5.4. Приклад немодифікованого зразка сої (відбувається ампліфікація тільки ендогенного контролю): VOF – відносні одиниці флуоресценції.

Результати аналізу не враховують:

- а) При відсутності ампліфікації за барвником JOE у зразка, що випробовується;
- б) При відсутності ампліфікації за барвником FAM або JOE у позитивного контролю;
- в) При наявності ампліфікації за барвником FAM у негативного контролю;
- г) За наявності ампліфікації за барвником FAM або JOE у NTC і/або НКВ контролях;
- д) За великої розбіжності значення C_t у паралельних вимірюваннях ($SD > 0,5$).

Аналогічні підходи існують і для ідентифікації інших трансформаційних подій.

Лабораторна робота 5.4. Проведення кількісного визначення ГМО методом ПЛР у реальному часі.

Принцип методу. Кількісне визначення ГМО проводять за допомогою ГМО-стандартів (GMO Concentration Reference Standards (JRS), або подібних). Вказані стандарти являють собою суміш борошна яке приготовлене із зерна 100 % генетично модифікованої ГМ-лінії рослини та зерна генетично немодифікованої рослини у відповідних співвідношеннях. ГМО-стандарти представлені для багатьох ГМ-ліній рослин. Як правило, такі стандарти випускаються в наступних концентраціях 0,1 %, 0,05 %, 1,0%, 2,0 %, 5,0 % 10,0 %. Для побудови калібрувальної кривої необхідно використання не менше трьох стандартів (найчастіше: 0,1 %, 1,0 % та 5,0 % або 10,0 %). Кількісне визначення можна проводити як за 35S-промотором і/або *nos*-термінатором так і за конкретною трансформаційною подією.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали, а також хід роботи є аналогічними до таких, які використовується для якісного визначення ГМО (див. лабораторну роботу 2). Відмінність полягає у тому, що при проведенні кількісного аналізу на стадії виділення ДНК паралельно із досліджуваними зразками виділяють ДНК також із ГМО-стандартів, і відповідно паралельно із досліджуваними зразками проводять дослідження ГМО-стандартів (у трьох повторах).

У результаті ампліфікації стандартів отримують калібрувальну криву, яка повинна відповідати наступним вимогам:

1. Кут нахилу калібрувальної кривої повинен становити $(-3,33 \pm 0,3)$ що свідчить про задовільну ефективність ампліфікації ГМО-стандартів. За 100% ефективності реакції ампліфікації кут нахилу дорівнює $-3,32$.

2. Значення коефіцієнта кореляції лінійної регресії (R^2) повинно становити $1 > R^2 > 0,98$.

На рис. 5.5 наведено криві ампліфікації, які отримані при постановці трьох ГМО-стандартів (0,1 %, 1,0 % і 10,0 %), а на рис. 5.6 – стандартний графік залежності порового циклу C_t від логарифму початкової концентрації субстрату (калібрувальна крива) за кількісного визначення ГМ-лінії сої *GTS 40-3-2*.

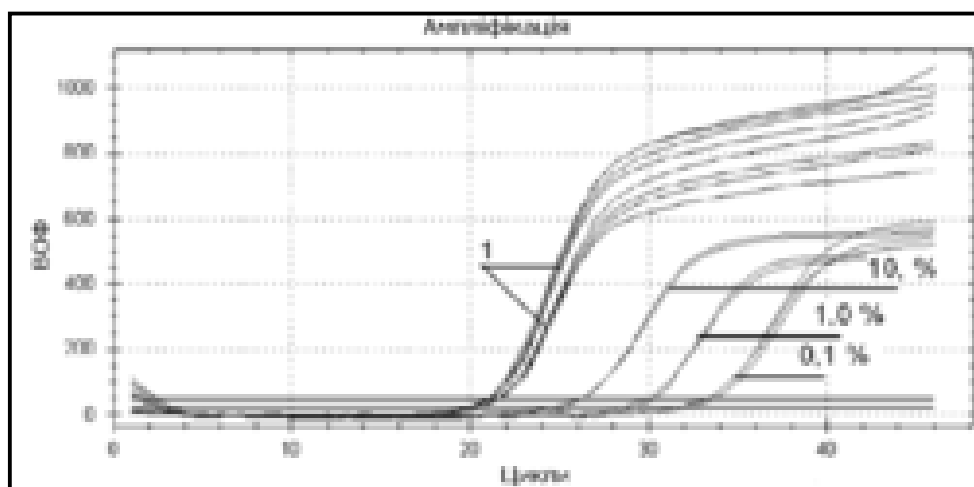


Рис. 5.5. Криві ампліфікації ГМО-стандартів ГМ сої лінії *GTS 40-3-2*.
1 – ендогенний контроль сої. ВОФ – відносні одиниці флуоресценції.

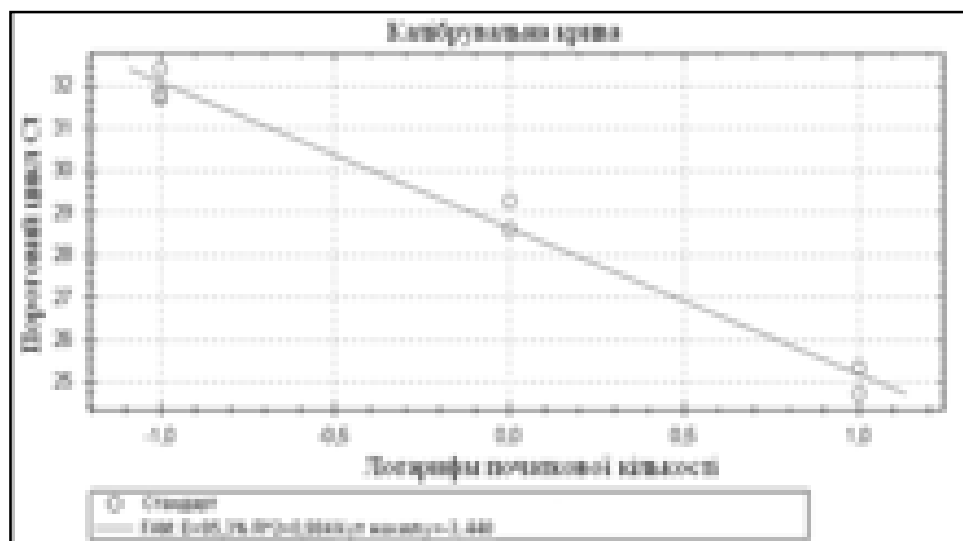


Рис. 5.6. Стандартний графік залежності порового циклу C_t від логарифму початкової концентрації субстрату.

Примітка. В нижній частині рисунка наведено характеристики калібрувальної кривої: кут нахилу (ефективність ампліфікації (E)) та лінійність (R^2)).

Ключовим моментом для кількісного визначення ГМО є розрахунок величини ΔCt , яка являє собою різницю кількості ГМ матеріалу (Ct_{FAM}) та кількості рослинного матеріалу (Ct_{JOE}):

$$\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{JOE}$$

Кількісний вміст ГМО розраховують у програмі *Microsoft Excel* або за допомогою опцій, що доступні у програмному забезпеченні окремих ампліфікаторів для проведення ПЛР у реальному часі.

За величинами ΔCt ГМО-стандартів будується калібрувальний графік – залежність ΔCt від відсоткового вмісту ГМО. За величинами ΔCt досліджуваних зразків по калібрувальному графіку, визначається кількість ГМО, яка виражається у відсотках (%) (рис. 5.7).

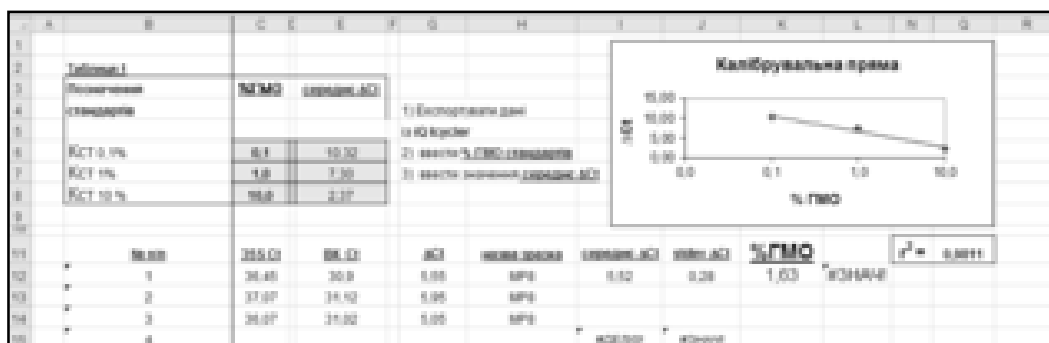


Рис. 5.7. Приклад обрахунку кількісного вмісту ГМ-лінії сої *GTS 40-3-2* (по *35S промотору*) за допомогою програми *Microsoft Excel*.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Баль-Прилипко Л.В. Сучасні методи досліджень сировини і харчових продуктів: підручник /Л.В.Баль-Прилипко, В.І. Корнієнко, С.В. Хижняк, Ю.П.Крижова, М.С.Ніколаєнко, В.М. Войціцький, О.А. Андрощук – К.: В-во НУБіП України, 2023. – 430 с.
2. Войціцький В.М. Аналітичні методи досліджень. Імунологічні методи аналізу і методи виявлення генетично модифікованих організмів та їх інгредієнтів: теоретичні основи і методики. Навчальний посібник/ В.М. Войціцький, М.Ф. Стародуб, С.В. Хижняк, Л.М. Іщенко – К.: ЦП «Компринт», 2018. – 159 с.
3. Войціцький В. М., Стародуб М. Ф., Хижняк С. В. Аналітичні методи досліджень. Електрохімічні методи аналізу: теоретичні основи і методики. Навчальний посібник. К.: ЦП «Компринт», 2017. 232 с.
4. Войціцький В.М. Аналітичні методи досліджень. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу: теоретичні основи й методики: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів/ В.М. Войціцький, С.В. Хижняк, В.А. Грищенко, В.А. Томчук, Ю.С. Баранов. К.: ЦП «Компринт», 2017. 268 с.
5. Войціцький В.М. Безпека. Методи контролю пестицидів у довкіллі та сільськогосподарській продукції: навчальний посібник/ В.М. Войціцький, М.Ф. Стародуб, С.В. Хижняк, Ю.С. Баранов. К.: Прінтеко, 2020. – 235 с.
6. Войціцький В.М. Безпека. Методи контролю важких металів у довкіллі та сільськогосподарській продукції: навчальний посібник / В.М. Войціцький, М.Ф. Стародуб, С.В. Хижняк, С.В. Мідик, Ю.В. Слива, В.І. Корнієнко / за ред. В.І. Корнієнко. – К.: Прінтеко, 2022. – 253 с.
7. ДСТУ Е № 12955-2001. Визначення афлатоксину В₁ та суми афлатоксинів В₁, В₂, G₁ та G₂ у зернових культурах, фруктах з твердою шкіркою та похідних від них продуктах. Метод високоефективної

- рідинної хроматографії за допомогою постколонкової дериватизації та очищення на імунній колонці.
8. ДСТУ ISO 17372:2009. Корми для тварин. Визначення зеараленону методом імуноафінної колонкової хроматографії та вискоєфективної рідинної хроматографії.
 9. ДСТУ 4689:2006. Продукти харчові. Методи визначання масової частки бенз(а)пірену.
 10. ДСТУ ISO 17993:2008 Якість води. Визначення 15 поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ) у воді методом вискоєфективної рідинної хроматографії з флуоресцентним детектуванням після рідинно-рідинного екстрагування.
 11. ДСТУ ISO 6465-2002. Якість води. Визначення вмісту окремих хлорорганічних інсектицидів, поліхлорованих біфенілів і хлорбензолів. Метод газової хроматографії після екстрагування (рідина-рідина).
 12. ДСТУ EN 1528 – 1 – 4 – 2002. Продукти харчові жири. Визначення пестицидів і поліхлорованих біфенілів (ПХБ).
 13. СОУ EN 12766 – 1 – 2 – 37552996 – 1:2017. Визначення поліхлорованих біфенілів (PCB) та споріднених сполук.
 14. ДСТУ ISO 3960 – 2001. Жири та олії тваринні і рослинні. Визначення пероксидного числа.
 15. ДСТУ 4350:2004. Олії. Методи визначення кислотного числа.
 16. ДСТУ 3661 – 97 (ГОСТ 12571 – 98). Цукор. Методи визначення сахарози.
 17. ДСТУ ISO 6885:2002. Жири та олії тваринні і рослинні. Визначення анізидинового числа.
 18. ДСТУ ISO 5555 – 2003. Жири тваринні і рослинні та олії. Відбирання проб.
 19. ДСТУ EN 12143: 2003. Соки фруктові та овочеві. Визначення вмісту розчинних сухих речовин. Рефрактометричний метод.

- 20.ДСТУ ISO 661: 2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Готування випробного зразка.
- 21.ДСТУ ISO 5725 (1-6):2003. Точність (правильність і прецизійність) методів та результатів вимірювання. К: Держспоживстандарт України, 2007.
- 22.ДСТУ ISO 11885:2005. Визначення 33 елементів методом атомно-емісійної спектrometerії з індуктивно-зв'язаною плазмою (якість води). К: Держспоживстандарт України, 2007.
- 23.ДСТУ ISO 6635:2004. Фрукти, овочі та продукти їх переробки. Визначення вмісту нітритів та нітратів спектрометричним методом молекулярної абсорбції.
- 24.ДСТУ ISO 5508-2001. «Жири та олії тваринні і рослинні. Аналізування методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот» (ISO 5508: 1990, IDT).
- 25.ДСТУ ISO 5509-2002. «Жири та олії тваринні і рослинні. Приготування метилових ефірів жирних кислот» (ISO 5509: 2000, IDT).
- 26.ДСТУ ISO 661:2004. «Жири тваринні і рослинні олії. Готування випробного зразка (ISO 661: 2003, IDT).
- 27.ДСТУ EN 12823-1: 2005. «Продукти харчові. Визначення вмісту вітаміну А методом рідинної хроматографії високороздільної здатності. Частина 1. Вимірювання транс-ретинолу і 13-цис-ретинолу».
- 28.ДСТУ – П SEM/TS 15568:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Відбирання проб. – К.: Держспоживстандарт України, 2009.
- 29.ДСТУ ISO 21569:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Якісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти. – К.: Держспоживстандарт України, 2009.

30. ДСТУ ISO 21570:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Кількісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти. – К.: Держспоживстандарт України, 2009.
31. ДСТУ ISO 21571:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Екстрагування нуклеїнової кислоти. – К.: Держспоживстандарт України, 2009.
32. Дубініна А.А. Токсичні речовини у харчових продуктах та методи їх визначення/ А.А. Дубініна, Л.П. Малюк, Г.А. Селютіна та ін. – К.: ВД «Професіонал», 2007.
33. Закон України «Про якість і безпеку харчових продуктів і продовольчої сировини» № 2116 – 15 від 21.10.2004 р.
34. Корнієнко В.І. Аналітичні методи визначення мікотоксинів методичні рекомендації/ В.І. Корнієнко, С.В. Хижняк, С.В. Мідик, Ю.В. Слива, В.С. Морозова, Т.П. Колеснікова, О.В. Березовський, В.М. Войціцький. К.: Видавництво «Наукова столиця», 2022. – 82 с.
35. Корнієнко В.І. Визначення поліциклічних ароматичних вуглеводнів спектрометричними та хроматографічними методами: методичні рекомендації/ В.І. Корнієнко, С.В. Хижняк, С.В. Мідик, І.В. Дзядевич, В.М. Войціцький. К.: Видавництво «Наукова столиця», 2023. – 71 с.
36. Мельничук Д.О. Аналітичні методи дослідження. Спектроскопічні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навчальний посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів/ Д.О. Мельничук, С.Д. Мельничук, В.М. Войціцький, В.А. Грищенко, Л.Г. Каланчук, С.В. Хижняк, В.І. Цвіліховський. К.: ЦП «Компринт», 2016. 289 с.
37. Наказ МОЗ України № 368 від 13.05.2013 у редакції наказу МОЗ України № 1238 від 22.05.2020. Розділ V. ДІОКСИНИ і ПХБ (PCBs).

АВТОРСЬКИЙ КОЛЕКТИВ

Войціцький Володимир Михайлович, доктор біологічних наук, професор, провідний науковий співробітник Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Корнієнко Валентина Іванівна, доктор біологічних наук, професор, директор Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Хижняк Світлана Володимирівна, доктор біологічних наук, професор, провідний науковий співробітник Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Самкова Оксана Петрівна, заступник директора з експертної роботи Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Вишнівський Петро Станіславович, доктор сільськогосподарських наук, провідний науковий співробітник Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного Університету біоресурсів і природокористування України.

Альтанова Альона Борисівна, кандидат педагогічних наук, доцент, факультет харчових технологій та управління якістю продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Навчальне видання

Войціцький Володимир Михайлович
Корнієнко Валентина Іванівна
Хижняк Світлана Володимирівна
Самкова Оксана Петрівна
Вишнівський Петро Станіславович
Альтанова Альона Борисівна

ПОСІБНИК

**АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ СИРОВИНИ І
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ
(СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНІ, ХРОМАТОГРАФІЧНІ,
ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ, ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ, ІМУНОЛОГІЧНІ)**

Підписано до друку
Ум. др. арк. Формат 60*84/16
Тираж 100 прим. Паперофсетним. Зам.№
Свідоцтво ДК 5941 від 11.01.2018 р.
м. Київ, вул. Героїв Оборони, 8 тел. 050-411-66-51; 044-22-99-
569

Видавництво (Наукова столиця)
ДРУК НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ
www.science.org.ua