

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра технологии переработки молока и мяса

Е.П. МИРОШНИКОВА

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СВОЙСТВ СЫРЬЯ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом
государственного образовательного учреждения высшего профессионального
образования «Оренбургский государственный университет»

Оренбург 2005

УДК 637.1 (0758)
ББК 36.95я73
М 64

Мирошникова Е.П.
М 64 **Методы исследования свойств сырья и молочных продуктов**
[Текст]: методические указания -Оренбург: ГОУ ОГУ, 2005.-60 с.

Данные методические указания содержат цикл лекций по дисциплине "Методы исследования свойств сырья и молочных продуктов", охватывающий основные разделы курса в соответствии с требованиями утвержденной программы.

Методические указания предназначены для студентов, обучающихся по программам высшего профессионального образования по специальности 260303 – Технология молока и молочных продуктов

Б 4001120000

ББК 36.95я73

© Мирошникова Е.П., 2005
©ГОУ ОГУ, 2005

1 Предмет и задачи курса

1.1 Значение методов исследования. Общая характеристика методов

Исследование любого пищевого продукта – сложная аналитическая задача. Из-за индивидуальности состава и многокомпонентности продуктов необходимо приспособливать стандартные методы к особенностям состава и физико-химической структуре продукта. При этом необходимо учитывать физическое состояние исследуемого вещества. Своеобразие состава пищевых продуктов осложняет подготовку проб: необходимо предварительно выделить (изолировать) компонент.

Только комплекс анализов (физико-химических, органолептических, микробиологических и др.) даёт возможность контролировать качество сырья и технологические процессы производства, а также готовую продукцию.

Своевременные физико-химические (инструментальные) методы анализа пищевых продуктов незаменимы при определении ультрамалых количеств вещества (10^{-10} %). Инструментальные методы анализа широко применяют при изучении химического состава сырья, полуфабрикатов и готовой продукции с целью создания оптимальных технологических процессов для переработки сырья и получения готовой продукции высокого качества.

В настоящее время в молочной промышленности широко применяют самые современные физические и физико-химические методы анализа: электрохимические, спектральные, хроматографические, реологические и др. За последние десятилетия получил распространение **потенциометрический метод** анализа, благодаря использованию электродов с высокой селективностью к определённым ионам в растворе.

Всё большее значение приобретают **вольтамперметрические методы** анализа, и в частности полярография. Полярографический анализ применяют для определения таких биологически активных соединений, как белки, аминокислоты, углеводы, витамины, а также микроэлементов и следов тяжёлых металлов. Можно одновременно определить несколько элементов, например медь, свинец, олово и цинк, при их совместном присутствии.

Спектральные методы анализа – одни из самых распространённых и широко применяемых методов. Они позволяют получить наиболее полную информацию о важнейших свойствах вещества и установить содержание веществ в объектах в диапазоне от 30-40 % до 10^{-3} %. К этим методам относят атомно-эмиссионный, спектрофотометрический, атомно-абсорбционный, нефелометрический, турбидиметрический, люминесцентный, а также рефрактометрический и поляриметрический.

С помощью **методов хроматографии** изучают состав и качество молочных продуктов. Анализ основан на разделении смеси веществ сорбционными способами в динамических условиях. Это один из наиболее универ-

сальных и эффективных методов разделения и анализа сложных органических и неорганических соединений.

Наряду с рассмотренными применяют и такие методы, как масс-спектрометрию, электрофоретические и другие новейшие методы исследования.

Использование **реологических методов** исследования позволяет получать готовые продукты постоянного, заранее заданного качества; совершенствовать технологические процессы, применять высокопроизводительное непрерывнодействующее автоматически управляемое оборудование, "конструировать" те или иные виды пищевых продуктов.

Современные физические и физико-химические методы исследования способствуют повышению надёжности технологического контроля на предприятиях и улучшению качества готовых продуктов.

1.2 Отбор проб и подготовка их к исследованию

Пищевые продукты исследуют качественными и количественными методами измерения. Выбор методов измерения зависит от свойств вещества, его количества и цели исследования. Общая схема исследования включает следующие стадии: постановка задачи, выбор метода, выбор аппаратуры, отбор пробы, подготовка пробы, проведение измерений, обработка результатов, оформление результатов.

Масштаб применяемого метода определяется имеющимся в распоряжении исследователя количеством вещества.

Масштаб метода	Масса пробы, г
Макро	0,5 - 100
Полумикро	0,01 - 0,5
Микро	10^{-3} - 10^{-2}
Ультрамикро	10^{-3}

Чувствительность метода определяется пределами обнаружения, т.е. минимальным количеством вещества, которое может быть обнаружено с достаточно высокой степенью достоверности.

Перед анализом проводят отбор проб. Под пробой понимают определённое количество нештучной продукции, отобранное для анализа. Отбор проб молока и молочных продуктов, подготовку их к анализу проводят в соответствии с ГОСТ 26809 - 86. Для микробиологических анализов пробы отбирают по ГОСТ 9225 - 84.

При подготовке образца необходимо сохранить свойства продукта, не допустить потерь (например, влаги), разрушения, а также попадания посторонних компонентов. Материал проб должен быть однородным. Для этого тщательно перемешивают среднюю пробу жидких и пастообразующих продуктов или измельчают и перемешивают в дальнейшем твёрдые и сухие продукты. Чем тоньше измельчение, тем выше однородность и точнее результаты анализа.

Среднюю пробу образца готовят непосредственно перед исследованием. Все операции проводят быстро во избежание потерь влаги за счет испарения.

Условие получения правильных средних величин – повторность исследования продукта одного наименования. За обязательный минимум принимают трёхкратность исследований.

Стандартом предусмотрено взятие точечной и объединённой пробы.

Точечная проба – проба, взятая одновременно из определённой части нештучной продукции (из цистерны, фляги, от монолита масла в ящике или брикета масла и т.п.).

Объединённая проба – проба, составленная из серии точечных проб, помещённых в одну ёмкость.

Точечные пробы жидких, вязких и сгущенных продуктов отбирают кружкой или черпаком вместимостью 0,1; 0,25; 0,5 дм³ с жесткой ручкой длиной от 50 до 100 см, металлической или пластмассовой трубкой внутренним диаметром (9±1,0) мм по всей длине и с отверстиями по концам.

При составлении объединённой пробы молока и молочных продуктов число точечных проб от каждой единицы тары с продукцией, включенной в выборку, должно быть одинаковым.

Перед отбором проб молоко и жидкие молочные продукты перемешивают от 1 минуты (механизированный способ перемешивания во флягах) до 15-20 минут (в железнодорожных цистернах) или путём пятикратного перевёртывания потребительской тары (бутылки и пакеты). При отстое жира в молоке и сливках в потребительской таре их нагревают до температуры (32±2) °С на водяной бане температурой (38±2) °С. Затем продукт из бутылки и пакетов сливают в посуду, составляя объединённую пробу.

Точечные пробы полутвёрдых, твёрдых и сыпучих продуктов отбирают шпателями, ножами или специальными щупами.

Точечные пробы творога, творожных изделий, домашнего сыра и сыров для плавления в транспортной таре отбирают щупом, опуская его до дна тары; в потребительской таре – освобождают продукцию от тары и тщательно перемешивают. В творожных полуфабрикатах начинку отделяют от теста.

Перед тем как отбирать пробы со сгущенными молочными консервами не вскрытые металлические банки массой 1000 г и более, а также фляги и бочки с продуктом переворачивают вверх дном и оставляют в таком положении на одни сутки. До отбора проб сгущенные молочные консервы перемешивают для равномерного распределения возможного осадка лактозы по всей массе продукта. В бочках и флягах сгущенные молочные консервы перемешивают мешалкой, а в потребительской таре – шпателем в течение 1-2 минут после вскрытия тары. Если на дне банки со сгущенным молоком с сахаром обнаружен осадок, банку погружают в воду температурой (55±5) °С и снова перемешивают до получения однородной массы, не допуская повышения температуры продукта выше (28±2) °С, затем охлаждают его до (20±2) °С.

Точечные пробы сухих молочных продуктов в транспортной таре отбирают шупом из разных мест каждой единицы транспортной тары с продукцией. От сгущенных и сухих молочных консервов в потребительской таре точечные пробы отбирают пробником, шупом или ложкой после вскрытия тары, помещают в посуду и составляют пробу для анализа.

Точечные пробы сливочного и топленого масла, пластических сливок в транспортной таре отбирают шупом (если температура масла ниже 10 °С, шуп нагревают в воде температурой (38±2) °С); в потребительской таре – ножом от каждого брикета.

Объединённую пробу масла помещают в водяную баню температурой (30±2) °С. При постоянном перемешивании пробу нагревают до размягчения массы и выделяют пробу, предназначенную для анализа.

Точечные пробы сыра отбирают с двух противоположных сторон каждой головки сыра, включенной в выборку, шупом, вводя его на глубину 3/4 длины. Для оценки органолептических показателей отбор точечной пробы проводят с одной стороны головки сыра.

В таблице 1 приведены объём и масса молочных продуктов, необходимых для анализа.

Таблица 1.1 - Объём и масса проб молочных продуктов

Продукт	Объём (масса) объединённой пробы, дм ³ (г)	Объём (масса) пробы для анализа, дм ³ (г)
Молоко, жидкие молочные продукты для детского питания, жидкие ЗЦМ	1	0,5
Сливки	0,5	0,1
Жидкие кисломолочные продукты	-	0,1
Сметана	500	100
Творог, творожные изделия и полуфабрикаты, домашний сыр, сыр для плавления, мороженое	500	100 (продукция без наполнителей) 150 (продукция с наполнителями)
Сгущенные молочные продукты	1000	300
Сухие молочные продукты	1200	200
Сливочное масло и пластические сливки	-	50
Сыры	-	50
Молочный сахар, пищевой и технический казеин	1200	300

Пробы молочных продуктов, предназначенные для анализов, готовят следующим образом.

Пробы, молока, сливок, сметаны, кисломолочных напитков, мороженого перемешивают путём перевёртывания посуды с пробами не менее 3 раз или переливания продукта в другую посуду и обратно не менее 2 раз.

Пробы молока и молочных продуктов доводят до температуры (20 ± 2) °С.

Пробы кисломолочных продуктов, имеющие густую консистенцию, а также пробы продуктов с отстоявшимся слоем сливок, нагревают на водяной бане до температуры (32 ± 2) °С, после чего охлаждают до (20 ± 2) °С.

Пробы творога, творожной массы, творожных изделий, полуфабрикатов и плавленых сладких сыров с наполнителями растирают в ступке до получения однородной консистенции, предварительно удалив из проб продукции с наполнителями цукаты, изюм или орехи.

Пробы сгущенных и сухих молочных продуктов растирают в ступке и тщательно перемешивают.

Пробы молочного сахара и казеина, предназначенные для анализа, измельчают в ступке или на лабораторной мельнице. Порошок просеивают через сито с отверстиями диаметром от 0,40 до 0,50 мм без остатка.

Перед исследованием большинство продуктов минерализуют – освобождают от органических соединений сухим или мокрым озолением. Сухое озоление в отличие от мокрого не требует реактивов, позволяет использовать относительно большое количество образца (5-10г, но не более), т.к. иначе наблюдаются значительные потери элементов, что важно при низком содержании определяемого элемента или низкой чувствительности метода. Однако возможны потери некоторых элементов, особенно в образцах, содержащих хлориды. Мокрое озоление, как правило, даёт меньше потерь элементов, но требует чистых реактивов, большего внимания оператора и ограничено массой образца от 2 до 5 г.

Выбор метода озоления зависит также от вида продукта, например, продукты с высоким содержанием жира или сахара рекомендуются сжигать сухим методом, а продукты, содержащие хлориды, – мокрым методом.

В большинстве случаев сухое озоление проводят при температуре 450-550 °С в течение 4-16 ч. При более низких температурах озоление затягивается, а в условиях повышенных температур возможно улетучивание некоторых элементов, например, железа. При озолении продуктов, содержащих большие количества хлоридов, наблюдаются потери Fe, Sb, Pb, Al, Cu за счет образования летучих хлоридов металлов. В этих случаях озоление проводят таким образом, чтобы перевести элементы в менее летучие нитраты или сульфаты. Чаще всего перед озолением к образцу добавляют нитрат магния либо смачивают образец разбавленной (1:1) азотной кислотой или разбавленной серной кислотой. Добавление нитратов, кроме уменьшения потерь, ускоряет озоление.

Для проведения мокрого озоления существует около десяти вариантов, но для большинства видов элементов и продуктов, в том числе относительно богатых жирами, рекомендуется использовать смесь трёх концентрированных кислот – азотной, хлорной и серной обычно в соотношении 3:2:1. Для низкожирных продуктов рекомендуется смесь азотной и хлорной кислот HClO_4 в соотношении 3:2. Смесь азотной и серной кислот, хотя и полностью

минерализует продукт, но сжигание протекает очень долго. Отдельно азотную или серную кислоту не используют из-за большой длительности минерализации.

Стадия озоления (минерализации) – основной источник, как потерь контролируемых металлов, так и загрязнения ими пробы. Особенно при сухом озолении в открытых кварцевых чашках, в общих лабораторных помещениях. Существуют методики минерализации в автоклавах, в герметичных условиях, под давлением, иногда в среде окислителя. По времени минерализация в автоклавах обычно длится не более 1,5 ч. Однако, такие разработки применимы к биологическим объектам менее сложного состава, чем молочные продукты.

Минерализацию проб молочных продуктов проводят в соответствии с ГОСТ 26929 - 94.

Подготовленные пробы исследуют по различным показателям в зависимости от поставленных задач. Для этого используют инструментальные и аналитические методы.

Инструментальные методы:

- спектральные методы исследования;
- турбидиметрия и нефелометрия;
- рефрактометрия;
- ультразвуковой метод исследования;
- электрохимические методы исследования;
- хроматографические методы исследования;
- электрофоретические методы исследования;
- эбуллиоскопия и криоскопия;
- реологические методы исследования

Аналитические методы:

- методы определения состава молока и молочных продуктов: сухого вещества, влаги, жира, белка, углеводов, хлоридов, спирта (этанола);

- методы определения показателей, характеризующих свойства молока и молочных продуктов: кислотность, плотность, термоустойчивость молока, чистота молока, микробное обсеменение, натуральность и наличие фальсифицирующих веществ, определение мажарного молока, эффективность гомогенизации и пастеризации, индекс растворимости сухих молочных продуктов, влагоудерживающая способность молочных сгустков.

2 Спектральные методы исследования

2.1 Сущность и классификация методов

Спектральные методы исследования основаны на использовании явлений поглощения (или испускания) электромагнитного излучения атомами или молекулами определённого вещества.

Поглощение или испускание квантов анализируемым веществом является сигналом, говорящим о качественном и количественном составе исследуемого вещества. Частота (длина волны) излучения определяется составом вещества. Интенсивность сигнала пропорциональна количеству части, вызвавших его появление, т.е. массе определяемого вещества или компонента смеси.

Спектральные методы дают широкие возможности для наблюдения и исследования сигналов в различных областях электромагнитного спектра – рентгеновское излучение, ультрафиолетовое (УФ) излучение, видимый свет, инфракрасное (ИК), а также микроволновое и радиоволновое излучение.

Механизмы взаимодействия излучения с исследуемым веществом в каждой области различны. Наиболее важными являются атомные и молекулярные переходы, вызываемые излучением различных областей электромагнитного спектра. Например, излучение квантов в рентгеновском диапазоне обусловлено электронными переходами во внутренних электронных слоях атома.

Для решения практических задач наибольшее значение имеют спектральные методы, в основе которых используют ультрафиолетовый, видимый, инфракрасный и радиоволновый диапазоны излучения.

Под воздействием этих излучений происходят электронные переходы в молекулах вещества или свободных атомов (аналитический сигнал – поглощение или испускание), а также изменение ориентации спинов атомов (аналитический сигнал – ядерный магнитный резонанс) или электронов (аналитический сигнал – электронный парамагнитный резонанс). Аналитические сигналы измеряют различными методами.

Таблица 2.1 - Классификация спектральных методов.

Спектроскопия	Источник аналитического сигнала	Аналитический сигнал	Метод
1	2	3	4
Молекулярная	Молекула	Поглощение (абсорбция) Испускание (люминесценция)	Молекулярно-абсорбционная спектрометрия (МАС) Молекулярно-люминесцентная спектрометрия (МЛС), или флуориметрия

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4
Атомная	Атом	Поглощение (абсорбция) Испускание (эмиссия)	Атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС) Атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС)
Магнитного резонанса	Ядро атомов	Ядерный магнитный резонанс – ЯМР-спектр	Спектрометрия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)
	Электрон	Электронный парамагнитный резонанс – ЭПР-спектр	Спектрометрия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)
Масс-спектроскопия	Ион	Масс-спектр	Масс-спектрометрия

По источнику и типу аналитического сигнала спектральные методы разделяют на молекулярно-абсорбционную спектрометрию (МАС) и молекулярно-люминисцентную (МЛС), или флуориметрию; на атомно-абсорбционную (ААС) и атомно-эмиссионную (АЭС), а также спектрометрию ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

2.2 Молекулярная спектроскопия

При изучении взаимодействия исследуемого вещества и электромагнитного излучения необходимо знать строение атомов и молекул.

При обычных условиях атомы находятся в основном энергетическом состоянии. При облучении потоком энергии внешние электроны атомов поглощают фотоны и возбуждаются. Возбуждённый электрон стремится вернуться в основное состояние. При возвращении в основное состояние происходит излучение. Спектр излучения атома является линейчатым (рисунок 2.1).

Молекула в возбуждённом состоянии S, может расходовать энергию возбуждения по одному из следующих механизмов: передать её другой химической частице при столкновении (колебательная релаксация III) или испустить её в виде излучения – люминесценция (флуоресценция IV).

Переходы в молекулах можно изучать, наблюдая избирательное поглощение или излучение в определённых областях электромагнитного спектра.

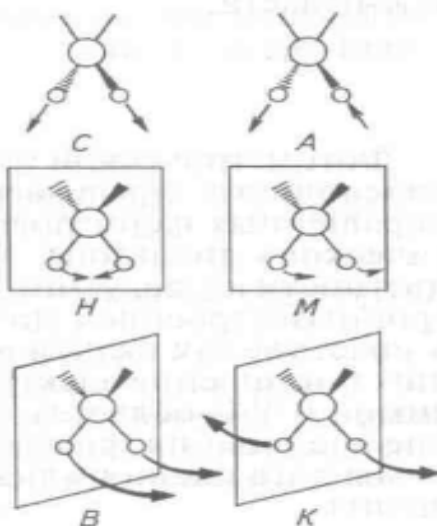
Различают следующие виды колебаний молекул: валентные (периодическое движение атомов вдоль оси связи) и деформационные, при которых происходит искривление или изгиб связи (рисунок 2.2).

Поглощение ИК – излучения при длинах волн от 0,7 до 4 мкм отвечает валентным колебаниям между атомами водорода и более тяжёлыми ато-

мами. Оно может быть использовано при идентификации функциональных групп, содержащих водород. Колебания атомов в молекуле по двойным и тройным связям относятся к длинам волн от 4 до 6,5 мкм, а при более длинных волнах помимо валентных происходят и деформационные колебания. Поглощение при длинах волн свыше 25 мкм соответствует колебаниям связей с участием тяжёлых металлов и групп атомов.



Рисунок 2.1 - Диаграмма энергетических уровней молекулы



С, А – валентные колебания соответственно симметричные и асимметричные; Н, М – деформационные колебания плоские соответственно ножничные и маятниковые; В, К – деформационные колебания неплоские соответственно веерные и крутильные

Рисунок 2.2 – Колебания молекулы на примере метильной группы

2.2.1 Молекулярно-абсорбционная спектрометрия

Любое вещество поглощает и отражает электромагнитное излучение. В молекулярно-абсорбционной спектрометрии исследуют излучение в области от 200 до 750 нм (УФ-излучение и видимый свет). Вещества, поглощающие излучение с длинами волн 400 - 750 нм (видимый свет), окрашены. Наряду с поглощением и отражением видимого света для анализа часто используют поглощение излучения в ультрафиолетовой (200 - 400 нм) и инфракрасной (0,8 - 25 мкм) областях спектра. Характер и величина поглощения и отражения света зависят от природы вещества и его концентрации в растворе.

Наиболее широкое распространение получили методы: **фотометрия** (изучение поглощения в видимой области спектра от 400 - 750 нм) и **ИК-спектрометрия** (от 0,8 - 25 мкм).

2.2.1.1 Фотометрия

Фотометрический метод количественного анализа основан на способности определяемого вещества поглощать электромагнитное излучение оптического диапазона.

Способность к поглощению зависит от цветности исследуемого вещества. Цветность определяется электронным строением молекул. Она зависит от наличия в молекуле так называемых хромофорных групп, обуславливающих поглощение электромагнитного излучения веществом в видимой и УФ-областях спектра.

Типичными хромофорами в органических соединениях являются $C = C$; $C = O$; $N = N$; $C = C - C = C$; $N = C - C = N$ и другие.

Для каждого поглощающего вещества имеется определённое распределение интенсивности поглощения по длинам волн.

При прохождении потока лучей через частично поглощающую среду, интенсивность прошедшего потока подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера.

Если светопоглощение раствора подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера, то оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации вещества в растворе. В этом случае график зависимости оптической плотности от концентрации выражается прямой линией, идущей из начала координат (рисунок 2.3).

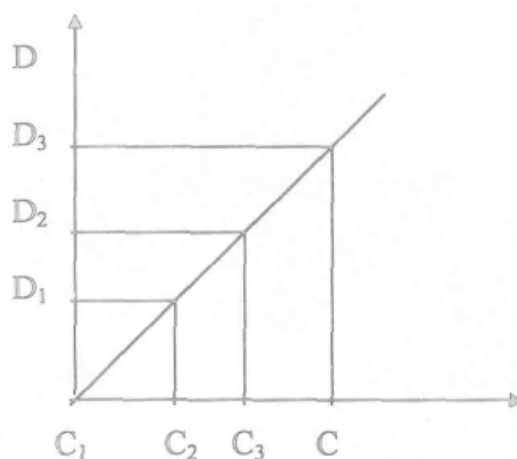


Рисунок 2.3 – Калибровочный график

График обычно строят по трём точкам, т.е. по трём стандартным растворам, что повышает точность построения графика и надёжность определений.

Если же основной закон светопоглощения не соблюдается, то прямолинейная зависимость нарушается. При отклонениях от закона Бугера-Ламберта-Бера, т.е. при нарушении линейной зависимости D от C , число точек на графике должно быть увеличено. Применение градуировочных графиков – наиболее распространённый и точный метод фотометрических измерений.

Общая схема выполнения фотометрического определения одина и включает следующие стадии:

- 1) подготовку пробы и переводение определяемого вещества в раствор, в реакционноспособную форму;
- 2) получение окрашенной аналитической формы определяемого вещества в результате проведения цветной реакции;
- 3) измерение светопоглощающей способности аналитической формы, т.е. регистрация аналитического сигнала при его наибольшей интенсивности.

Промышленностью выпускаются различные приборы молекулярно-абсорбционной спектроскопии – колориметры, фотометры, фотоэлектродетекторы, спектрофотометры и т.д., в которых установлены различные комбинации источников света, монохроматизаторов и рецепторов.

2.2.1.2 ИК-спектроскопия

Инфракрасная спектроскопия – это метод анализа химических соединений, при котором поглощается энергия в пределах инфракрасного излучения (тепловое излучение). ИК-спектроскопию применяют для идентификации практически любого соединения.

Различные молекулы, содержащие одну и ту же атомную группировку, дают в ИК-спектре полосы поглощения в области одной и той же частоты. Такие частоты дают возможность по спектру установить конкретные группы атомов в молекуле и тем самым определить качественный состав вещества и строение молекулы. Например, полосы в области $3000 - 3600 \text{ см}^{-1}$ могут быть приписаны только $O - H$ – или $N - H$ - связям, полосы в области

2800 - 3000 см^{-1} - связи C – H, появление полосы в области 3300 - 3500 см^{-1} характерно для NH_2 группы, связь C = C характеризуется частотой 1650 см^{-1} , связь C \equiv C - частотой 2100 см^{-1} .

К настоящему времени изучены и систематизированы инфракрасные спектры более чем 20000 соединений, что существенно облегчает практическое проведение анализа.

Иногда задача качественного анализа может быть решена простым сопоставлением спектра известного соединения и анализируемого вещества.

Количественный анализ по инфракрасным спектрам основан на применении закона Бугера-Ламберта-Бера. Чаще всего используют метод градуировочного графика.

Использование спектрометрического ИК-метода – одно из перспективных направлений в контроле показателей состава молока и молочных продуктов (жир, белок, влага, лактоза и др.). При использовании этого метода практически отсутствует подготовка пробы продукта.

Инфракрасные анализаторы для контроля состава молока работают в диапазоне волн 2,5-12 мкм. Метод основан на свойстве компонентов молока (жира, белка, лактозы и воды) избирательно поглощать ИК-излучение на определённых длинах волн. Так, максимумы поглощения жира наблюдаются при длинах волн 3,5 и 5,73 мкм, белка - 6,46, лактозы - 9,6, воды - 4,42 мкм.

ИК-анализатор представляет собой однолучевой или двухлучевой инфракрасный спектрофотометр, состоящий из трёх основных блоков: подготовки пробы, спектрофотометрических измерений, преобразования сигналов и вычислений. С помощью таких анализаторов контролируют состав заготавливаемого, обезжиренного и пастеризованного молока, а также при соответствующей подготовке пробы - сливок, кисломолочных продуктов, сгущённых продуктов.

В настоящее время разработаны ИК-анализаторы для контроля состава молочных продуктов при работе в ближней инфракрасной области спектра 0,8 - 2,5 мкм (БИК-анализаторы). В БИК-анализаторах ИК-излучение поступает на образец, помещённый в кювету. Излучение, диффузно отражаясь от образца, собирается на специальном приёмнике, где преобразуется в электрический сигнал, и усиливается в электронном блоке. С помощью встроенных микропроцессоров осуществляется обработка данных, и результаты измерений переводятся в цифровую форму.

Так в России создан БИК-анализатор "Аналикон" для контроля массовой доли жира, белка и влажности в сухих молочных продуктах (сухое цельное и обезжиренное молоко и сухой казеин).

Наряду с многокомпонентными БИК-анализаторами созданы промышленные и лабораторные однокомпонентные приборы, например для контроля влажности сухих молочных продуктов.

2.2.2 Молекулярно-люминесцентная спектрометрия (флуориметрия)

Метод анализа, основанный на измерении интенсивности флуоресценции, называется флуориметрией. Флуоресценция (люминесценция - испускание света) обусловлена поглощением веществом света определённой длины волны. Поглощение ультрафиолетового света определёнными молекулами с легковозбуждаемыми электронами приводит к флуоресценции в видимой спектральной области. Этот процесс начинается с перехода электронов с основного энергетического уровня S_0 на более высокие энергетические уровни (S_1 и S_2) (рисунок 2.4).

Поглощённая электроном энергия излучается тогда не одним квантом, а серией квантов, каждая из которых имеет меньшую энергию, чем квант возбуждающего излучения. Многие органические и неорганические соединения при облучении ультрафиолетовым светом флуоресцируют в видимой части спектра на диаграмме энергетических уровней.

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

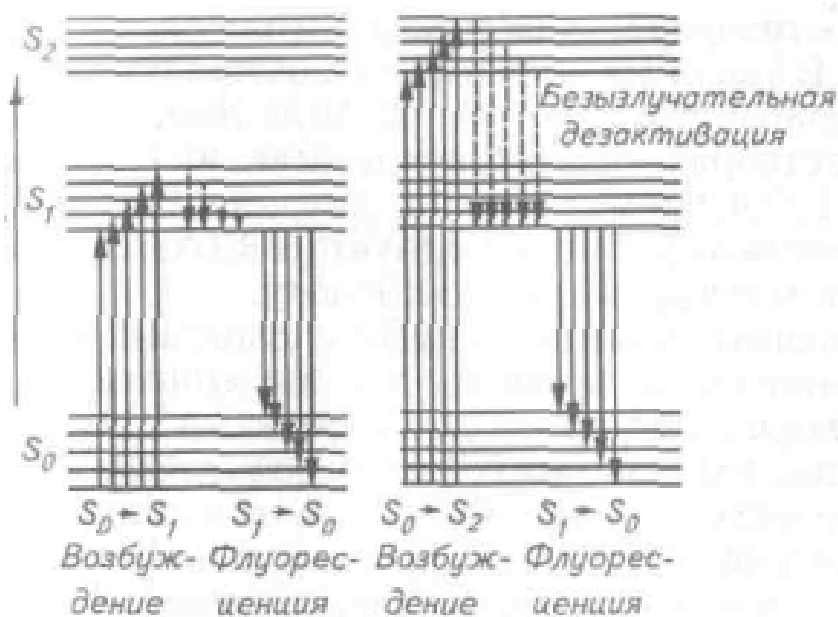


Рисунок 2.4 – диаграмма энергетических уровней молекулы при флуоресценции

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

Флуоресценция свойственная относительно небольшому числу соединений (прежде всего ароматическим соединениям и порфиринам).

Основным преимуществом флуориметрии по сравнению с другими абсорбционными методами является высокая селективность, так как флуоресценцией обладает значительно меньшее число веществ.

Флуориметрический метод применяют для чувствительного определения очень малых количеств элементов при анализе органических веществ, при определении малых количеств витаминов, гормонов, антибиотиков, канцерогенных соединений и др.

Методом флуориметрии можно определить содержание жира в молоке, количество микроорганизмов в сырье, продукте, смывах, при контроле качества мойки оборудования; контролировать молоко на мастит по содержанию соматических клеток.

2.3 Атомная спектроскопия

В атомной спектроскопии вещества исследуют, переводя их в состояние атомного пара – **атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС)** или газообразное состояние – **атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС)**.

В атомно-абсорбционной спектроскопии для возбуждения атомов используют тепловую энергию. Распыляя образец в пламени, соединения переводят в атомный пар (атомизация). Большинство атомов, возбуждаясь, переходит на более высокий энергетический уровень. При обратном переходе происходит выделение энергии.

При облучении атомов исследуемого элемента, находящихся в состоянии пара, линейчатым излучением того же самого элемента в возбуждённом состоянии происходит резонансное поглощение. Оно сопровождается уменьшением интенсивности линейчатого облучения. Измеряемое поглощение является мерой концентрации свободных атомов образца.

В атомно-эмиссионной спектроскопии возбуждения происходят при помощи электрических зарядов. При этом создаются высокие температуры, благодаря которым большинство атомов переходят в возбуждённое состояние. Поглощение энергии этими атомами невозможно, поэтому происходит эмиссия (испускание) фотонов возбуждённых атомов.

При помощи атомной спектроскопии в большинстве случаев определяют металлы. Исследование проводят чувствительным селективным методом при длине волны, характерной для каждого элемента.

Пределы обнаружения элементов методом атомной спектроскопии достигают 10^{-12} - 10^{-14} г.

Метод атомной спектроскопии находит широкое применение в химии, биохимии, экологии и др., а также в анализе различных видов сырья и пищевых продуктов. Метод позволяет определить около 70 различных элементов.

2.3.1 Атомно-абсорбционная спектрометрия

Атомно-абсорбционная спектрометрия основана на измерении поглощения электромагнитного излучения атомным "паром" анализируемого вещества. Измеряют фотометрически разность интенсивности излучения до и после прохождения через анализируемый образец. Ослабление излучения для входящего светового потока происходит по зависимости, которая идентична закону Бугера-Ламберта-Бера.

При постоянной толщине поглощающего слоя градуировочный график представляет собой прямую, проходящую через начало координат.

Прибором, позволяющим осуществить метод атомно-абсорбционной спектрометрии, является атомно-абсорбционный спектрометр.

Сравнивая результаты измерений в исследуемой пробе с результатами измерений в стандартных растворах, определяют содержание элемента в пробе.

Для атомизации пробы используют атомизаторы двух типов: пламенные и непламенные.

При реализации пламенного варианта атомно-абсорбционной спектрометрии анализируемая проба распыляется в пламени горелки. Капли раствора быстро разлагаются до молекулярного уровня. Молекулы диссоциируют, образуя атомы отдельных элементов. Лишь около 10% исследуемого раствора действительно попадает в пламя, что ограничивает чувствительность метода. Другой важной причиной является короткое время существования атомов элементов в пламени.

Температура пламени горючих газовых смесей, наиболее часто используемых в атомно-абсорбционной спектрометрии от 1700 до 3400 °С (таблица 2.2).

Для определения таких металлов, как медь, цинк, железо, свинец и кадмий, в основном применяют пламя ацетилен - воздух, реже пропан - воздух. Пламя водород - воздух (1725 °С) рекомендуется для анализа щелочных элементов. Пламя ацетилен - оксид азота (I) (3400 °С) благодаря его высокой температуре рекомендуется для определения элементов с высокой энергией диссоциации (вольфрам, ванадий, молибден).

Таблица 2.2 – Температура пламени газов

Горючая смесь		Температура пламени, °С
Горючий газ (топливо)	Газ-окислитель	
Водород	Воздух	1725
Пропан	Воздух	1825
Ацетилен	Воздух	2050
Водород	Кислород	2800
Пропан	Кислород	2900
Ацетилен	Кислород	3200
Ацетилен	Оксид азота (I)	3400

Для реализации непламенного варианта атомно-абсорбционной спектроскопии чаще всего используют высокотемпературные печи. Это в основном графитовые трубчатые печи, так называемые графитные кюветы, в которых разогрев происходит за счёт пропуска электрического тока (электрометрическая атомизация). В кювету вводят анализируемую пробу, обычно объёмом 1 - 100 мкл, затем нагревают кювету электрическим током. Температура кюветы повышается ступенчато, так что на первой стадии достигается сравнительно низкая температура, обеспечивающая испарение растворителя. На второй стадии температура кюветы повышается так, чтобы произошло сухое озоление пробы. И, наконец, кювета быстро разогревается до температуры 3000 °С, при которой происходит атомизация. На этой стадии и производится измерение абсорбционного сигнала. На первых двух стадиях через кювету пропускают очищенный инертный газ (аргон или азот). Но на стадии атомизации поток инертного газа останавливают, чтобы атомы оставались в абсорбционном состоянии по возможности дольше.

Основными достоинствами графитовых атомизаторов являются низкие пределы обнаружения элементов и возможность анализировать очень малые объёмы проб. В среднем пределы обнаружения различных металлов при работе с графитовыми анализаторами на 2-3 порядка ниже, чем в пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии.

Определение элементов в атомно-абсорбционном методе заключается в измерении относительной интенсивности двух световых потоков. Один из них проходит через анализируемое вещество, другой является контрольным.

Одновременное измерение интенсивности двух световых потоков, проводят с двухлучевыми атомно-абсорбционными спектрофотометрами.

2.3.2 Атомно-эмиссионная спектроскопия

В атомно-эмиссионной спектроскопии исследуют атомно-эмиссионные спектры, полученные в результате возбуждения атомов в газообразном состоянии.

Для перевода атомов в газообразное состояние и их возбуждения используют плазму, в качестве среды для получения плазмы применяют аргон. Существует два способа получения плазмы. В одном из них возбуждение происходит под действием электрических разрядов между электродами - плазма постоянного тока, а в другом - энергия высокочастотного переменного тока передаётся газу с помощью магнитной индукции - индуктивно-связанная плазма. При этом создаются высокие температуры, благодаря которым большинство атомов переходит в возбуждённое состояние. Поглощение энергии такими атомами невозможно, поэтому при переходе из возбуждённого состояния в основное происходит эмиссия (испускание) фотонов, интенсивность которой пропорциональна числу возбуждённых атомов. Количественное определение элемента производят так же, как в атомно-абсорбционной спектроскопии.

2.4 Спектроскопия магнитного резонанса. Масс-спектрометрия

Применение радио- и микроволновой областей электромагнитного спектра в аналитической химии и физико-химических исследованиях основывается на явлениях ядерного магнитного и электронного парамагнитного резонансов.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) изучает магнитный резонанс, возникающий в результате взаимодействия магнитного момента ядра с внешним магнитным полем. С помощью метода ЯМР можно исследовать ядра с собственным моментом количества движения (спин ядра) и связанным с ним магнитным моментом ядра.

Согласно квантовой механике собственный момент количества движения (спин) ядра принимает строго определённые значения. Спин ядра является вектором, поэтому имеет направление. Во внешнем магнитном поле для спина ядра возможны две ориентации: вдоль и против направления силовых линий внешнего магнитного поля. Каждому значению спина соответствует определённое значение энергии. Переориентация спина ядра с изменением направления сопровождается поглощением энергии. Такие переходы вызываются воздействием на ядро радиочастотной области электромагнитного спектра. При этом анализируемая система поглощает энергию при строго фиксированных значениях частоты, т.е. наблюдается явление резонанса. Такое поглощение энергии измеряют экспериментально. Оно прямо пропорционально напряжённости магнитного поля в месте расположения ядра.

Теория магнитного резонанса применима не только к ядрам, но и к электронам, поскольку последние также имеют спин и магнитный момент.

Масс-спектрометрия занимает особое положение среди спектроскопических методов. В строгом смысле слова этот метод не является спектроскопическим, т.к. вещество при анализе не подвергается воздействию электромагнитного излучения. Этот метод получил своё название из-за формального сходства и графического изображения масс-спектров со спектрами спектроскопических методов. Масс-спектрометрия основана на изучении тока от фрагментов ионов, полученных из нейтральных молекул вещества путём воздействия на них пучка электронов.

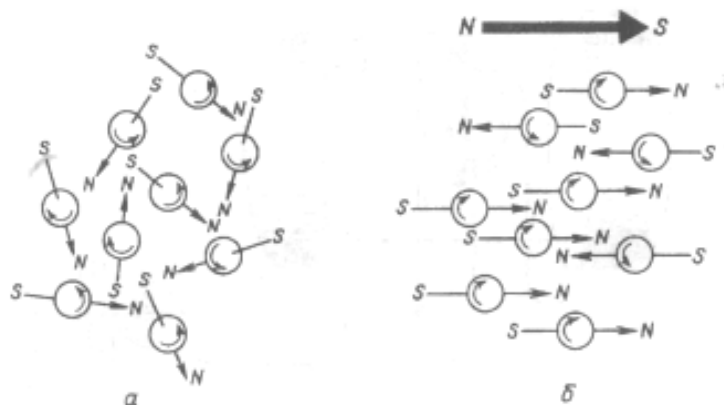
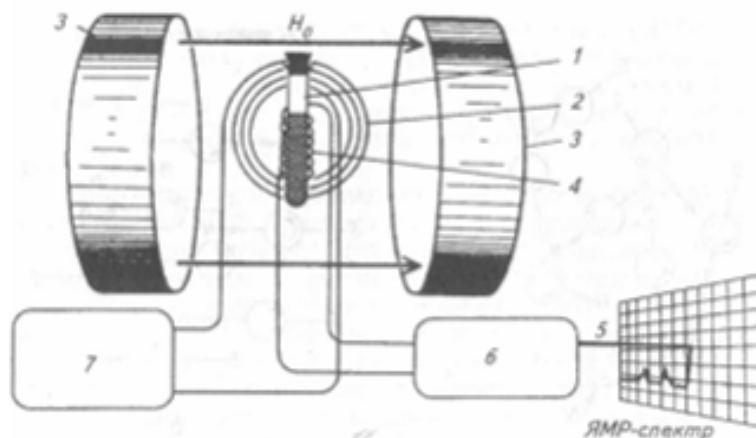


Рисунок 2.5 – Ориентация спинов электронов в отсутствии внешнего магнитного поля (а) и под действием внешнего магнитного поля (б)

2.4.1 Спектрометрия ядерного магнитного резонанса

Вещество, исследуемое методом ЯМР, помещают одновременно в два магнитных поля – одно постоянное, а другое радиочастотное. Измерение осуществляют на ЯМР-спектрометре, основными составляющими элементами которого являются: электромагнит, генератор радиочастотного излучения, датки, в который помещают пробирку с образцом, электронный усилитель, самописец.



1 – пробирки с образцом; 2 – катушка генератора радиочастотного поля; 3 – магнит; 4 – датчик катушка приемника радиочастотного поля; 5 – самописец для регистрации ЯМР-спектр; 6 – детектор и усилитель сигнала; 7 - генератор радиочастотного излучения

Рисунок 2.6 – Принципиальная схема ЯМР-спектрометра

В ЯМР-методе используют следующие аналитические параметры: химический сдвиг, константа спин-спинового взаимодействия, интенсивность сигнала, время релаксации.

Значения химических сдвигов приводятся в каталогах и атласах ЯМР-спектров.

Взаимодействие полей ядер друг с другом через одну или несколько связей называется спин-спиновым взаимодействием.

2.4.2 Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия основана на получении ионов из нейтральных молекул путём воздействия на них пучком электронов, обладающих энергией, достаточной для ионизации. При этом образуются в основном положительные ионы, которые могут распадаться на отдельные фрагменты.

Молекула, возбуждённая в результате взаимодействия с электроном (с энергией более 10^3 кДж/моль), распадается с образованием положительного молекулярного иона и электрона (ионизация).

Молекулярный ион обладает значительной внутренней энергией и быстро распадается далее (10^{-8} - 10^{-10}) с образованием заряженных и незаряженных фрагментов (фрагментация).

Осколочные ионы, в свою очередь, могут распадаться с образованием новых фрагментов. Иногда фрагментация сопровождается перегруппировками. Процесс фрагментации молекулярных ионов происходит до тех пор, пока не образуются ионы, внутренней энергии которых недостаточно для их дальнейшего превращения. Образующийся молекулярный ион и его фрагменты оцениваются по их массовым числам, представляющим отношение m/e , т.е. массы к заряду. Так как в большинстве случаев образуются однозарядные ионы, то отношение m/e соответствует массе иона. Масс-спектрометры работают при высоком вакууме, что сводит к минимуму нежелательные межмолекулярные реакции и, кроме того, благоприятствует внутримолекулярной фрагментации.

Масс-спектр представляет собой спектр линий положительно заряженных ионов.

Минимальным для анализа является количество вещества менее 20 мкг, предел чувствительности составляет 10^{-9} - 10^{-12} г.

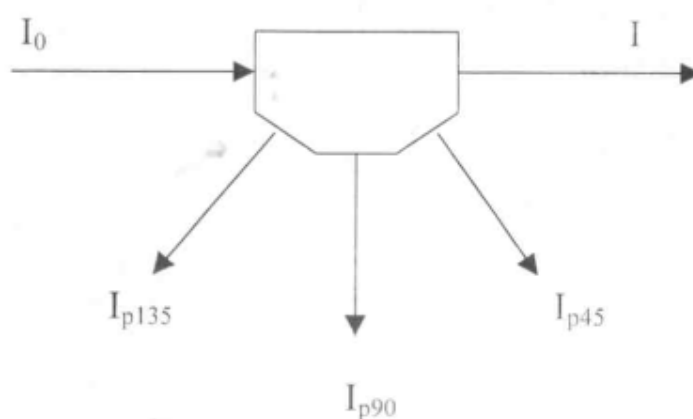
Метод масс-спектрометрии применяют в научно-исследовательской практике для идентификации соединений и установления строения неизвестных веществ, точного определения молекулярной массы, определения элементного состава, анализа следовых количеств биологически активных соединений, анализа многокомпонентных смесей и т.п.

3 Оптические методы

3.1 Турбидиметрия и нефелометрия

Турбидиметрический и нефелометрический оптические методы исследования дисперсных систем растворов связаны с рассеянием света частицами дисперсной фазы, которое зависит от длины волны излучения, размера и формы рассеивающих частиц и иногда от их расположения в пространстве.

Все измерения связаны с видимым излучением. Пробы освещают потоком излучения интенсивностью I_0 , а затем измеряют интенсивность излучения, рассеянного под определённым углом (например, 90° , I_{p90}) (рисунок 3.1).



I_0 – интенсивность падающего излучения

I – интенсивность прошедшего излучения

I_{p45} , I_{p90} , I_{p135} – интенсивность излучения, рассеянного под разными углами

С ростом числа частиц в суспензии отношения I/I_0 уменьшается, а отношение I_{p90}/I_0 увеличивается до умеренных концентраций. Для очень разбавленных суспензий измерение под углом гораздо чувствительнее, чем измерения, когда источник и детектор находятся на одной линии, поскольку при этом можно наблюдать слабый рассеянный свет на тёмном фоне. Метод, в котором используют линейное измерение, называют турбидиметрией, а метод с измерением под углом 90° (или каким-либо другим) - нефелометрией.

Турбидиметрия основана на измерении интенсивности светового потока, прошедшего через дисперсную систему I . Если принять рассеянный свет за поглощённый, то можно получить соотношение, аналогичное соотношению по закону Бугера-Ламберт-Бера для поглощения света растворами:

$$D = \lg I_0/I = k l C$$

где D – оптическая плотность раствора; l – толщина слоя; k – эмпирическая константа; C – концентрация.

Так как поглощения света в данном случае практически не происходит, используют понятие оптической плотности D , которая может быть измерена на фотоэлектроколориметре.

Нефелометрия основана на измерении интенсивности света, рассеянного дисперсной системой I_p .

В нефелометрическом анализе используется рассеяние света взвешенными частицами, находящимися в растворе (суспензии). Если через кювету, наполненную суспензией пропускать свет, то часть его будет отражена, часть поглощена, а часть рассеяна во всех направлениях. Обычно рассеяние света наблюдают в направлении, перпендикулярном к направлению падающего пучка света.

Способность частиц к рассеиванию или отражению света определяется размером частиц и длиной волны падающего света.

Интенсивность I_r потока рассеянного света подчиняется уравнению Релея:

$$I_r = I_0 \cdot K \cdot N$$

где I_0 – интенсивность падающего света;

N – общее число частиц в данном объеме;

K – эмпирическая константа.

Более высокая чувствительность нефелометрического метода по сравнению с чувствительностью турбидиметрического объясняется прямым изменением аналитического сигнала, что позволяет определять не только концентрацию и размер частиц, но и форму, характер взаимодействия и другие свойства.

При нефелометрических определениях сравнивают светорассеяние одинаково приготовленных суспензий одних и тех же веществ в одних и тех же приборах. Поэтому все величины, зависящие от типа выбранной суспензии и от типа прибора остаются постоянными. Очень существенно при приготовлении коллоидных растворов сохранять постоянной величину объема частиц. Эта величина зависит от концентрации исходных растворов, порядка и скорости смешения, температуры, времени существования суспензии, присутствия посторонних веществ, т.д.

Таким образом, если взять отношение оптических плотностей для двух дисперсных систем с одинаковым размером частиц, оно будет равно отношению концентраций, а при одной и той же концентрации отношение оптических плотностей пропорционально размерам частиц. Размер частиц в турбидиметрическом анализе не имеет такого значения, как в нефелометрическом.

Конструкции приборов для нефелометрических и флуориметрических измерений идентичны, поэтому любой флуориметр можно использовать в качестве нефелометра. Многие серийные флуориметры снабжены специальными приспособлениями для нефелометрических измерений.

Для турбидиметрических измерений можно использовать любой фотометр или спектрофотометр. Если растворитель и рассеивающие частицы бесцветны, максимальная чувствительность достигается при использовании излучения голубой или ближней ультрафиолетовой области.

Турбидиметрический метод анализа применяют в определении состава сырья и оценке технологических процессов. Этим методом можно измерить содержание жира в молоке, оценить степень дисперсности жира, исследовать процесс свёртывания молока, определить готовность сгустка и сливок к сбиванию, установить концентрацию микроорганизмов при производстве бактериальных концентратов.

3.2 Рефрактометрия и поляриметрия

Рефрактометрический и поляриметрический оптические методы широко используют в практике анализа пищевых продуктов.

При прохождении через поверхность раздела двух сред световой луч отклоняется от первоначального направления, т.е. преломляется. Величина угла отклонения зависит от концентрации и температуры среды. Угол падения и преломления связан соотношением, которое называется показателем преломления. Рефрактометрия основана на измерении показателя преломления.

Некоторые вещества обладают оптической активностью, т.е. они способны вращать плоскость поляризованного луча. Метод поляриметрии основан на определении угла вращения поляризованного луча.

3.2.1 Рефрактометрия

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

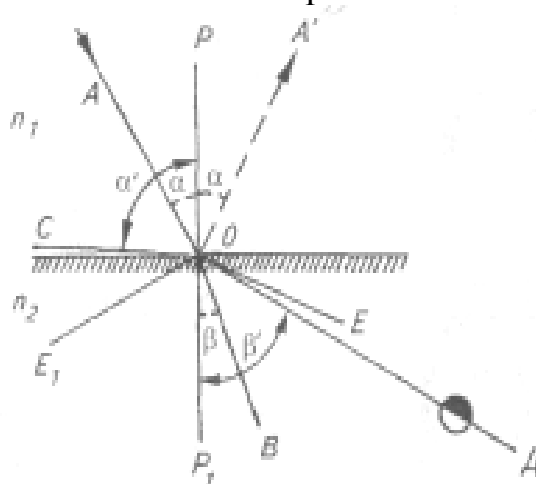


Схема 3.2 - Преломления лучей света

Преломление луча света описывается законом Снелля:

$$n_1 \cdot \sin\alpha = n_2 \cdot \sin\beta$$

где α – угол падения;

β – угол преломления;

n_1, n_2 – показатель преломления 1 и 2 сред.

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

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

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

Если луч света А направлен под углом α из среды с меньшим показателем преломления в среду с большим показателем преломления, то, изменив направление, он приближается к перпендикуляру PP_1 и угол преломления β будет меньше угла падения α . Если луч В переходит из среды более плотной в среду менее плотную, то преломляясь, он удаляется от перпендикуляра и занимает положение луча А. Если при переходе из менее плотной среды в более плотную падающий луч С образует с перпендикуляром угол α , приближающийся к 90° , то соответствующий ему луч преломления Д будет давать с перпендикуляром угол β' , лежащий в меньшей угловой области. Так как угол падения не может быть больше 90° , то соответствующий ему преломленный луч Д является пограничным лучом распространения света в этой среде. Луч Е, падающий под углом, больше предельного, не преломляется, а полностью отражается, он претерпевает "полное внутреннее отражение" от границы раздела, приобретая направление OE_1 . С правой стороны от луча Д будет темнота, а с левой - свет.

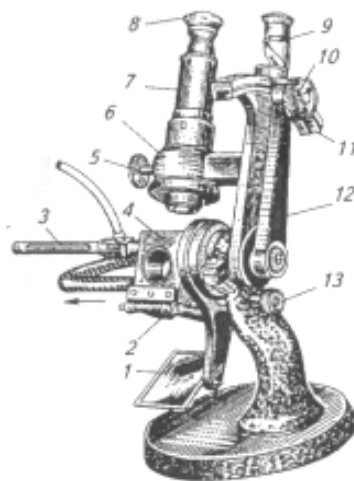
Устройство рефрактометров основано на явлении полного внутреннего отражения на границе раздела двух сред, из которых одна является более плотной. Рефрактометры имеют две призмы – измерительную и осветительную. Измерительная призма изготовлена из оптического стекла с высоким известным показателем преломления. Одна из её граней служит границей раздела, где происходит преломление и полное внутреннее отражение.

Применяемые рефрактометры показывают не угол полного внутреннего отражения, а непосредственно показатель преломления – процент сухого вещества (по сахарозе) или по условной шкале – число рефракции. В зависимости от исследуемых веществ и условий, для которых составлены таблицы, измерения выполняют при температурах 17,5, 20 и 40 °С. Постоянную температуру поддерживают с помощью ультратермостата.

При рефрактометрировании в качестве источника света используют натриевое пламя, естественный дневной свет или электролампы (75 – 100 В).

Стандартным рефрактометром является прибор Аббе.

Рефрактометр ИРФ-454, предназначенный для измерения показателя преломления и средней дисперсии неагрессивных жидкостей и твёрдых тел, служит для экспресс-анализа концентрации лактозы в молоке и молочных продуктах, а также сахарозы в пищевых продуктах, массовой доли сухих веществ в сгущённом молоке с сахаром. Все измерения проводят в белом свете. Показатель преломления прозрачных сред определяют в проходящем свете, а полупрозрачных - в отражённом. Среднюю дисперсность вещества определяют, пересчитывая показания шкалы по показателю преломления вещества с помощью таблиц, прилагаемых к инструкции прибора.



1 – зеркало; 2 – камера измерительной призмы; 3 – термометр; 4 – камера осветительной призмы; 5, 10 – винт для перемещения компенсатора и линзы; 6 – компенсатор; 7 – зрительная труба; 8 – окуляр; 9 – линза; 11 – шкала; 12 – алидада; 13 – винт для установления рефрактометра наклонно

Рисунок 3.3 – Рефрактометр типа Аббе (универсальный)

3.2.2 Поляриметрия

Многие прозрачные вещества, характеризующиеся отсутствием симметрии в их молекулярной и кристаллической структуре, обладают способностью вращать плоскость поляризованного излучения. Такие вещества называют оптически активными. Наиболее активными из них являются кварц и сахар. Однако многие органические и неорганические соединения также обладают этим свойством. Угол вращения плоскости поляризации изменяется в широких пределах для разных веществ. Вращение называют правым (+), если оно происходит в направлении движения часовой стрелки для наблюдателя, и левым (-), если оно происходит против движения часовой стрелки.

Угол вращения зависит от числа молекул, расположенных на пути пучка света или в случае раствора от концентрации его и длины сосуда. Он также зависит от длины волны излучения и температуры.

Таким образом, метод исследования вещества, основанный на измерении величины угла вращения плоскости поляризации света при прохождении его через оптически активные вещества, называется поляриметрией.

Ассиметрический углеродный атом в сахарах делает их оптически активными, способными вращать плоскость поляризации. Это свойство является функцией концентрации водных растворов сахара, поэтому измеряя угол вращения α , можно определить содержание сахаров.

Характерным показателем каждого оптически активного вещества является его удельное вращение $[\alpha]_D^{20}$ – угол вращения плоскости поляризации при 20 °С для линии Д натриевого пламени раствором, содержащим 100 г вещества в 100 см³, когда луч в этом растворе проходит путь, равный 100 мм.

Для сахарозы $[\alpha]_D^{20}$ равен +66,5°; моногидрата лактозы +52,5°; безводной лактозы +55,3°.

Концентрация вещества (г в 100см³ раствора) рассчитывают по формуле:

$$C = (\alpha \cdot 100) : ([\alpha]_D^{20} \cdot l)$$

где α – угол вращения, град;

$[\alpha]_D^{20}$ – удельное вращение анализируемого вещества при температуре 20 °С;

l – длина поляризационной трубки, дм.

При работе с поляриметром пользуются однородным жёлтым светом натриевого пламени.

4 Электрохимические методы

Электрохимические методы исследования основаны на использовании процессов, происходящих в электролитической ячейке (гальваническом элементе, цепи) – системе из электродов и электролитов, контактирующих между собой. При отсутствии электрического тока ($I = 0$) в замкнутой гальванической цепи на межфазной границе устанавливается равновесие, и потенциал достигает равновесного значения. Если через ячейку проходит электрический ток ($I \neq 0$), на межфазной границе равновесие не достигается и электроны переходят из электрода в раствор.

В состав электролитической ячейки входят два или три электрода, один из которых - **индикаторный** или рабочий, второй - **электрод сравнения** и третий - **вспомогательный**. Электрод, действующий как датчик и реагирующий на фактор возбуждения, но не изменяющий состава раствора за время измерения, является индикаторным.

Электрод сравнения служит для создания измерительной цепи и поддержания постоянного значения потенциала индикаторного (рабочего) электрода. Используемый в трёхэлектродной ячейке вспомогательный электрод (противоэлектрод) вместе с рабочим электродом включен в электрическую цепь.

Электрические параметры (сила тока, напряжение, сопротивление) могут служить аналитическими сигналами, если они измерены с достаточной точностью. Электрохимические методы анализа используют либо для прямых измерений, основанных на зависимости "аналитический сигнал-состав", либо для индикации конечной точки титрования в титриметрии. Электрохимические методы анализа позволяют определять концентрацию вещества в широком интервале ($1 - 10^{-9}$ моль/л) с достаточной точностью и воспроизводимостью.

Электрохимические методы анализа объединяют методы без протекания электродной реакции, в которых строение двойного электрического слоя в расчёт не принимается (кондуктометрия), и методы, основанные на электродных реакциях в отсутствие тока (потенциометрия) или под током (вольтамперометрия и др.).

4.1 Кондуктометрия

Кондуктометрический метод основан на определении электрической проводимости веществ в различных растворах. По величине электропроводности можно судить о концентрации растворённого вещества.

Электропроводность раствора электролита - результат диссоциации растворённого вещества и миграции ионов под действием внешнего источника напряжения. В поле электрического тока, движущиеся в растворе ионы испытывают тормозящее действие со стороны молекул растворителя и окружающих противоположно заряженных ионов. Результатом такого тормозя-

щего действия является сопротивление раствора прохождению электрического тока. Электропроводность раствора определяется в основном числом, скоростью (подвижностью) мигрирующих ионов, количеством переносимых ими зарядов и зависит от температуры и природы растворителя.

Различают удельную (См/м) и эквивалентную (См·м²/экв) электропроводности раствора.

Электропроводность раствора зависит от его концентрации. По мере возрастания концентрации растворённого электролита увеличивается количество ионов - переносчиков зарядов, т.е. растёт удельная электропроводность. Однако после достижения определённого максимального значения удельная электропроводность начинает уменьшаться, поскольку для сильных электролитов усиливается релаксационный эффект, а для слабых электролитов уменьшается степень их диссоциации.

Большое распространение в аналитической практике получил метод кондуктометрического титрования, основанный на химической реакции, в результате которой заметно изменяется электропроводность раствора.

Кондуктометрическое титрование обладает рядом достоинств: возможно дифференцированное титрование смесей кислот или оснований, титрование мутных и окрашенных растворов. Нижний предел определяемых концентраций 10⁻⁴ моль/л, погрешность определений 2 %.

Электропроводность раствора измеряют в соответствующей электролитической ячейке, представляющей собой стеклянный сосуд с вмонтированными электродами.

Как правило, электроды, изготовленные из листовой пластины, жестко закреплены, так что расстояние между ними не изменяется.

Расстояние между электродами и их поверхность выбирают в зависимости от сопротивления раствора: чем выше измеряемое сопротивление, тем больше должна быть площадь электродов и меньше расстояние между ними. С учётом этого выбирают ячейку.

Кондуктометрические измерения можно проводить при постоянном или переменном токе. Чаще с источником переменного тока частотой 500 - 5000 Гц.

Проведены исследования по выявлению маститного молока кондуктометрическим методом. Результаты исследований показали, что в маститном молоке содержание ионов хлора увеличивается в 2,2 раза, а ионов натрия в 2,8 раза по сравнению с содержанием в молоке здоровых коров. Соответственно удельная электропроводность повышается в среднем на 37 %. Поскольку при заболевании коров маститом резко увеличивается число соматических клеток, то исследовали взаимозависимость между электропроводностью молока и содержанием в нём соматических клеток. В результате разработана методика контроля определения маститного молока кондуктометрическим методом с пересчетом удельной электропроводности на содержание соматических клеток.

4.2 Потенциометрия

Потенциометрическим методом определяют содержание веществ в растворе, а также различные физико-химические параметры, например окислительно-восстановительный потенциал и др.

Главное достоинство потенциометрического метода – быстрота и простота проведения измерений. Используя микроэлектроды, можно проводить измерения в пробах объёмом до десятых долей миллилитра. Потенциометрическим методом можно исследовать мутные и окрашенные растворы, вязкие пасты, при этом исключаются операции фильтрации и перегонки. Погрешность определения при прямом потенциометрическом измерении составляет 2-10 %, при проведении потенциометрического титрования 0,5-2 %.

Потенциометрический метод основан на измерении потенциалов электродов, погружённых в исследуемый раствор. Экспериментально измеряют разность потенциалов (ЭДС).

В потенциометрии обычно применяют гальванический элемент, включающий два электрода: **индикаторный** (потенциал которого зависит от активности (концентрации) определённых ионов в растворе) и **сравнения** (потенциал которого не зависит от концентрации определяемых ионов).

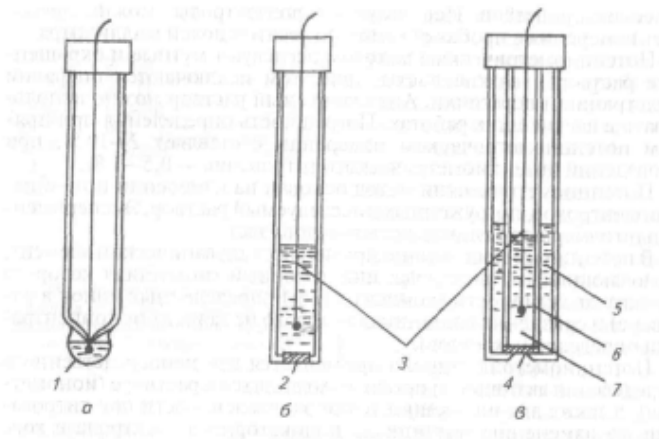
Потенциометрия широко применяется для непосредственного определения активности ионов, находящихся в растворе (ионометрия), а также для измерения потенциала индикаторного электрода в ходе титрования (потенциометрическое титрование).

В потенциометрии используют два основных класса индикаторных электродов: электронно- и ионообменные.

Электроннообменные электроды изготавливают из инертных металлов (платины, золота).

Ионообменные (ионоселективные) электроды содержат чувствительный элемент – мембрану, разделяющую внутренние раствор и электрод и одновременно служащую средством электролитического контакта с внешним (исследуемым) раствором. Мембрана обладает ионообменными свойствами.

В зависимости от типа мембраны электроды бывают стеклянные, с твёрдой, жидкой, плёночной и другими мембранами (рисунок 4.1).



а – стеклянный; б – с твердой кристаллической мембраной; в – с жидкой мембраной; 1 – стеклянная мембрана; 2 – твердая кристаллическая мембрана; 3 – внутренний электрод (токоотвод); 4 – пористый диск; жидкая мембрана (ионообменник) 5 – полупроницаемая инертная мембрана; 7 – водная фаза

Рисунок 4.1 – Ионоселективные электроды

При измерении ЭДС необходим полуэлемент, потенциал которого был бы известен, постоянен и не зависел бы от состава исследуемого раствора. Электрод, удовлетворяющий этим требованиям, называют **электродом сравнения**. Электрод сравнения должен быть прост в изготовлении и сохранять практически постоянный потенциал.

Наиболее распространён хлорсеребряный электрод сравнения (Ag, AgCl/KCl), который изготавливают путём нанесения хлорида серебра на серебряную проволоку. Электрод погружают в насыщенный раствор хлорида калия.

Кроме хлорсеребряного электрода в качестве электродов сравнения применяют каломельный и таламидный электроды.

4.2.1 Характеристика измерительных устройств

Устройства, применяемые для измерения потенциала – потенциометры (рН-метр, ионметр), состоят из двух блоков: измерительного и датчика, и могут отличаться друг от друга конструкцией.

Электродная система может быть выполнена конструктивно в виде двух отдельных электродов (индикаторного и электрода сравнения) или в виде комбинированного электрода, где оба электрода объединены в одном корпусе.

В настоящее время разработаны рН-метры и ионметры для исследования молока и молочных продуктов нового поколения: рН-метр – милливольтметр рН-150М; ионметр лабораторный И-160; рН-метры – иономеры "Экотест-120" и анализатор качества сред КСМК "Луч" и др.

4.2.2 Потенциометрическое титрование

Титрометрия - это количественный аналитический метод, заключающийся в определении концентрации определённого вещества путём постепенного добавления к анализируемому раствору реактива известной концентрации до полного завершения реакции с определяемым веществом. Для контроля за ходом титрования и установлением конечной точки титрования можно использовать ионоселективные электроды, если они чувствительны к определяемому иону или иону титранта.

Титрант - это применяемый для титрования раствор реактива, вступающего в реакцию с определяемым ионом или соединением. Титрант добавляют к титруемому раствору постепенно порциями определённого объёма из точно градуированной бюретки. Концентрацию определяемого вещества устанавливают по объёму титранта, необходимому для завершения реакции.

Результаты измерений методом потенциометрического титрования более точны, чем при использовании прямой потенциометрии.

В ходе титрования измеряют и записывают ЭДС ячейки после добавления каждой порции титранта. В начале титрант добавляют небольшими порциями, при приближении к конечной точке (резкое изменение потенциала при добавлении небольшой порции реактива) порции уменьшают. Для определения конечной точки потенциометрического титрования (точки эквивалентности) можно использовать различные способы. Наиболее простой способ - построение кривой титрования: графика зависимости потенциала электрода от объёма титранта.

Другой способ состоит в расчёте изменения потенциала (ΔE) на единицу изменения объёма титранта, то есть $\Delta E/\Delta V$.

Ионоселективные электроды удобны для фиксирования конечной точки титрования, поскольку их показания не зависят от степени окрашенности и прозрачности раствора.

Метод потенциометрического титрования применяют для контроля титруемой кислотности и массовой доли белка в молоке. Измерение титруемой кислотности основано на нейтрализации кислот, содержащихся в продукте, раствором гидроксида натрия до рН 8,9, измерении массовой доли белка - на формольном титровании до рН 9.

4.3 Вольтамперометрия

Вольтамперометрия - высоко чувствительный метод анализа органических и неорганических веществ. Современные приборы для вольтамперометрии позволяют снизить границу измеряемых концентрацией и добиться высокой селективности по определяемому веществу. Этот метод в настоящее время довольно успешно конкурирует с широко распространёнными методами атомно-абсорбционной спектроскопии.

Вольтамперометрический метод анализа основан на использовании явления поляризации микроэлектрода, получении и интерпретации вольтам-

перных (поляризационных) кривых, отражающих зависимость силы тока от приложенного к рабочему электроду напряжения.

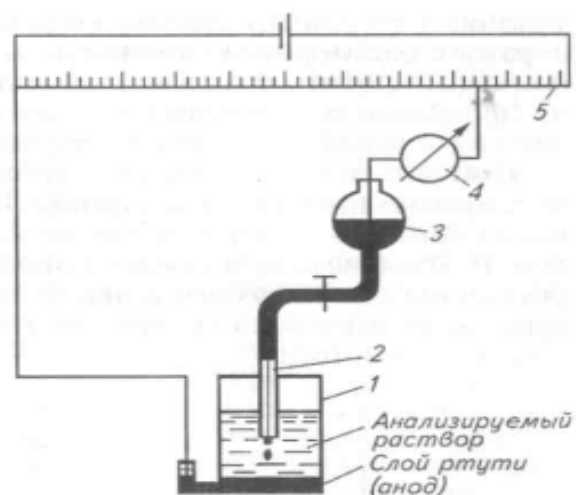
Таким образом, вольтамперометрия основана на изучении **поляризационных** или **вольтамперных кривых** (кривых зависимости силы тока от напряжения), которые получаются, если при электролизе раствора анализируемого вещества постепенно повышать напряжение и фиксировать при этом силу тока.

В вольтамперометрии используют два электрода: рабочий поляризуемый электрод с малой поверхностью и неполяризуемый электрод сравнения. Если в качестве рабочего выбран электрод с постоянно обновляющейся поверхностью (например, ртутный капающий электрод), то метод анализа называют полярографическим (рисунок 4.2).

Электролиз следует проводить с использованием легкополяризуемого электрода с небольшой поверхностью, на котором происходит электровосстановление или электроокисление веществ.

Поскольку в вольтамперометрии один из электродов не поляризуется и для него потенциал остаётся постоянным, подаваемое на ячейку напряжение проявляется в изменении потенциала только рабочего электрода. Таким образом, регистрируемая вольтамперная кривая (полярограмма) отражает электрохимический процесс, происходящий только на одном электроде.

Если в растворе присутствуют вещества, способные электрохимически восстанавливаться или окисляться, то кривая имеет форму волны. В отсутствие электрохимической реакции эта зависимость линейна.



1 – электролизер; 2 – ртутный капающий электрод (катод); 3 – резервуар ртути; 4 – гальванометр; 5 - реохорд

Рисунок 4.2 – Схема полярографической установки

Напряжение, при котором начинается электролиз, зависит, прежде всего, от природы восстанавливающихся ионов. Оно зависит также от концентрации этих ионов в растворе, от присутствия в растворе других электролитов, а также от того, находится ли определяемый металл в виде хлорида, нитрата, аммиачного комплекса и т.д.

Полярографическая кривая выглядит следующим образом.

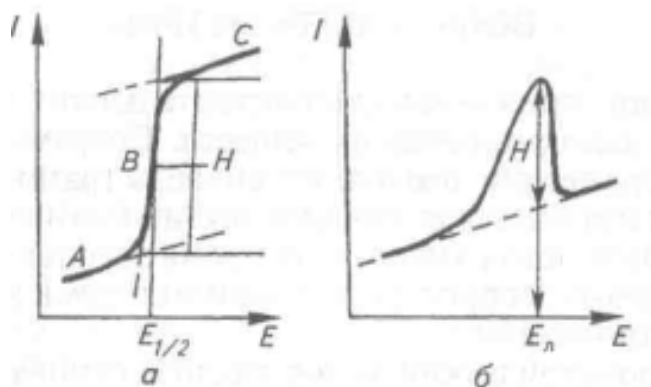


Рисунок 4.3 – Измерение высоты волны (а) и пика (б) на полярограмме

При низких значениях потенциала (А), величина которого недостаточна для того, чтобы на рабочем электроде происходила электрохимическая реакция, через ячейку проходит очень незначительный остаточный ток. При увеличении потенциала электрохимически активное вещество (называемое деполяризатором) вступает в электрохимическую реакцию на электроде и сила тока в результате этого резко возрастает (В). Это ток называется фарадеевский ток. Сила тока возрастает до некоторого предельного значения, оставаясь затем постоянной (С).

Величина $E_{1/2}$ служит **качественной** характеристикой полярографически активного вещества.

Количественной характеристикой анализируемого соединения в полярографии является величина равная высоте волны (пика), которая является линейной функцией концентрации (рисунок б).

В вольтамперометрии с успехом применяют также твёрдые микроэлектроды, изготавливаемые из благородных металлов или графита. Конструктивно твёрдые электроды удобнее и безопаснее, чем ртутные, но область их применения несколько ограничена.

Аналитические возможности вольтамперометрического метода анализа очень широки. Метод используют для определения неорганических и органических соединений различного состава. Интервал определяемых концентраций 10^{-2} - 10^{-6} М, нижний предел достигает 10^{-9} М, при определении малых концентраций погрешность не превышает 3 %.

5 Хроматографические методы исследования

5.1 Классификация методов хроматографии

Принцип хроматографического анализа был впервые предложен М.А.Цветом в 1903-1905 гг. для разделения компонентов растительных пигментов, близких по своему строению. Поскольку при этом методе получают отдельные полосы окрашенных веществ, он назвал этот метод хроматографией, что значит "цветопись". Применение этого термина не оправдано при анализе бесцветных веществ, однако, он прочно укоренился.

В современных методах исследований хроматографией называют процесс разделения веществ, основанный на разделении компонентов смеси между неподвижной (стационарной) и подвижной (мобильной) фазами. В зависимости от строения разделяемые вещества в различной степени удерживаются той или иной фазой и вследствие этого могут быть отделены друг от друга. Хроматографический метод используют для разделения и очистки смесей веществ.

Под действием диффузии молекулы разделяемых веществ пересекают поверхность раздела фаз, и в зависимости от свойств удерживаются той или иной фазой.

В простейшем варианте разделение происходит при прохождении потока анализируемой смеси через колонку, содержащую сорбент. Из-за различной сорбируемости компонентов смеси, их разделение по высоте сорбента достигается при повторяющихся циклах сорбции - десорбции.

Известно несколько подходов к классификации методов хроматографии с использованием различных признаков:

- по средам, в которых проводится разделение (жидкостная, газожидкостная, газовая);
- по механизму разделения (молекулярная или адсорбционная, ионообменная, осадочная, окислительно-восстановительная);
- по форме проведения процесса (колоночная, капиллярная, хроматография на бумаге и в тонком слое);
- по способу проведения процесса (фронтальная, вытеснительная, проявительная).

В таблице 5.1 хроматографические методы систематизированы по подвижным и неподвижным фазам, форме проведения процесса и принципу разделения.

Таблица 5.1 - Классификация методов хроматографии по принципу разделения

Методы хроматографии	Подвижная фаза (ПФ)	Неподвижная фаза (НФ)	Форма неподвижного слоя	Принцип разделения
1	2	3	4	5
Жидкостная:				
твердо-жидкостная	Жидкость	Твердая	Колонка	Адсорбционный
жидкостно-жидкостная	"-	Жидкость	"-	Распределительный
ионообменная	"-	Твердая	"-	Ионный обмен
Газовая:				
газоадсорбционная	Газ	"-	"-	Адсорбционный
газожидкостная	"-	Жидкость	"-	Распределительный
Гель-хроматография	"-	"-	"-	По размерам молекул
Хроматография в тонком слое	"-	Твердая	Тонкий слой	Адсорбционный
Хроматография на бумаге	"-	Жидкость	Хроматографическая бумага	Распределительный
Аффинная	"-	Лиганд	Колонка	Адсорбционный

Каждый хроматографический метод по мере развития сопровождается возникновением новых вариантов.

5.2 Жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография (ЖХ) - это метод разделения и анализа сложных смесей, в котором подвижной фазой является жидкость. Метод ЖХ имеет более широкий круг анализируемых объектов, чем газовая хроматография, поскольку большинство веществ не обладает достаточной летучестью, многие неустойчивы при высоких температурах (особенно высокомолекулярные соединения) и разлагаются при переходе в газообразное состояние.

При этом методе неподвижную фазу помещают в колонку, затем вносят в неё анализируемую смесь и элюируют подходящим растворителем. При продвижении по колонке компоненты смеси удерживаются сорбентом в соответствии с их физико-химическими свойствами и, следовательно, мигрируют с разной скоростью. Из колонки разделяемые вещества смеси выходят в определённой последовательности и могут быть собраны в виде определённых фракций.

В методе ЖХ разделение проводят, как правило, при комнатной температуре.

5.3 Газовая хроматография

Газовая хроматография (ГХ) - это метод разделения и определения летучих соединений: газов (при нормальной температуре) или паров (при по-

вышенной температуре). Компоненты анализируемой смеси распределяются между неподвижной фазой (твёрдое вещество или жидкость) и газом-носителем (подвижная фаза). Газ-носитель переносит разделяемые вещества через колонку.

В зависимости от состояния фаз различают газотвердофазную или газоадсорбционную хроматографию (ГАХ) и газожидкостную (распределительную) хроматографию (ГЖХ) (таблица 5.2).

Твёрдая неподвижная фаза применяется в газоадсорбционной хроматографии (ГАХ). Разделение обусловлено адсорбционными свойствами наполнителя колонки по отношению к разделяемым соединениям, преимущественно газам. Распространённые адсорбенты - силикагель, активированный уголь, цеолиты.

Таблица 5.2 – Варианты газовой хроматографии

Метод	Неподвижная фаза	Принцип разделения	Область применения метода
Газожидкостная (распределительная) хроматография (ГЖХ)	Жидкая фаза, нанесенная на инертный материал-носитель	Распределение	Анализ газов и паров жидкостей; методические возможности выше, чем для ГАХ
Газоадсорбционная хроматография (ГАХ)	Адсорбент	Адсорбция	Анализ газов и паров жидкостей

Жидкая неподвижная фаза применяется в газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Она распределяется в виде тонкой плёнки на поверхности инертного твёрдого носителя. Большой выбор жидких фаз, позволяющий работать в широком температурном диапазоне (20-400 °С), делает ГЖХ наиболее удобным хроматографическим методом разделения не только жидких, но и некоторых твёрдых соединений. Низкие пределы обнаружения, экспрессность, точность и простота операций обеспечили методу широкое применение для анализа сложных объектов.

Газовую хроматографию применяют для получения чистых веществ, выделения веществ (жирных и органических кислот, карбонильных и хлорорганических соединений), концентрация которых в смеси мала, выделения метаболитов в биохимии.

5.4 Гель - хроматография

Гель - хроматография - метод разделения веществ, основанный на различной способности молекул разного размера проникать в поры нейтрального геля, который служит неподвижной фазой. Метод известен под названиями "гель - проникающая", "эксклюзионная" и "молекулярно - ситовая хроматография". Последнее название наиболее полно отражает сущность метода, однако, более распространён термин "гель - проникающая хроматография".

В качестве неподвижной фазы применяют гели, имеющие определённый размер пор, подвижной фазы - водные или органические элюенты. Наиболее простое объяснение механизма разделения в гель - хроматографии состоит в том, что молекулы анализируемых веществ распределены между неподвижным растворителем в порах сорбента и элюентом, протекающим через слой неподвижной фазы. Молекулы с размером, позволяющим проникать в поры сорбента при движении вдоль колонки задерживаются в порах. Молекулы, имеющие размеры большие, чем поры, не проникают в сорбент и вымываются из колонки со скоростью движения элюента. Молекулы, проникающие в поры всех размеров, движутся наиболее медленно. Снижение скорости движения компонентов вдоль колонки прямо связано с количеством пор, в которые способны диффундировать распределяемые частицы (рисунок 5.1).

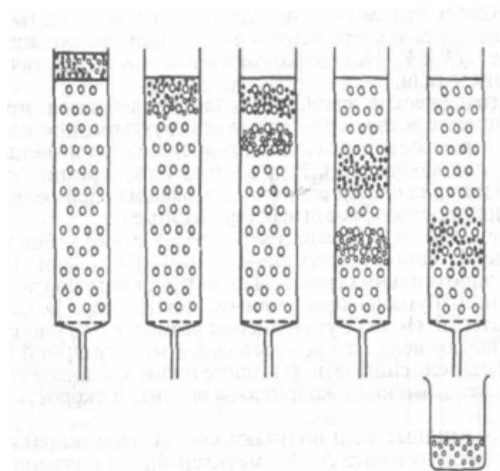


Рисунок 5.1 – Схема разделения веществ методом гель-хроматографии

Таким образом, методом гель - хроматографии можно разделять смеси веществ в зависимости от размеров их молекул. Выход компонентов из колонки происходит в порядке снижения их молекулярных масс. Вытекающие из колонки растворы анализируют различными методами, например, спектрофотометрическим, фотометрическим, титриметрическим.

Наиболее широкое распространение среди носителей для гель - хроматографии белков получили сорбенты, приготовленные на основе декстрана (сефадексы, сефакрилы, молселекты), полиакриламида (биогели Р, акрилексы), агарозы (сефарозы, биогели А) и др. Набухая в воде они образуют гели.

Гранулы геля обладают высокой механической прочностью, химически устойчивы (стабильны в области рН 3-11, выдерживают стерилизацию в автоклаве при температуре до 120 °С), устойчивы к действию органических растворителей.

Номер в маркировке сефадекса означает его пористость. Выбор определённой марки сефадекса определяется молекулярной массой исследуемого белка. Для обессоливания растворов белков и их концентрирования используют сефадексы G - 25 и G - 50 (грубый и средний). При разделении же смеси белков пользуются сефадексами тонкого или сверхтонкого зёрнения. Чем

мельче частицы геля, тем эффективнее происходит разделение, но тем меньше скорость протекания раствора через колонку.

Гели готовят путём насыщения водой в течение 5-20 часов соответствующего гелеобразователя (сефадекс, полиакриламид и др.). Продолжительность и температура насыщения указаны на упаковке препарата.

5.5 Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография основана на динамическом стехиометрическом обмене ионов между анализируемым раствором и ионообменником (ионитом). Ионит (неподвижная фаза) представляет собой нерастворимую полимерную матрицу, несущую химически связанные ионогенные группы. Противоионы удерживаются на матрице за счёт сил электростатического взаимодействия и могут обмениваться на ионы разделяемой смеси, присутствующие в подвижной фазе.

Этот метод широко применяется при анализе, разделении и очистке органических и неорганических соединений, ионизирующих в водных и неводных растворителях.

При фракционировании белков методом ионообменной хроматографии большое внимание уделяют выбору ионообменника (природе материала и ёмкости ионита) и буферного раствора (величине рН и ионной силы, природе буфера и буферной ёмкости).

Белки могут быть разделены как на катионитах, так и на анионитах.

Тип ионообменника определяется природой функциональных ионогенных групп.

Ионит является слабокислотным при наличии карбоксильных групп; сильнокислотным при наличии сульфогрупп ($-\text{SO}_3\text{H}$); слабоосновным при наличии аминогрупп различной степени замещения; сильноосновным при наличии групп четвертичных аммониевых оснований.

Хроматографию на анионитах ведут в таких системах, где диссоциируемым компонентом является катион (буферы: трис, пиридин, имидазол и др.), а для катионитов - анион (ацетатный, фосфатный, бикарбонатный буфер и др.).

При этом методе смесь белков сорбируется в верхней части колонки и затем вытесняется веществами, уменьшающими их сорбцию. Понижение сорбции осуществляют повышением ионной силы раствора или изменением его рН (рисунок 5.2)

Разделение аминокислот методом ионообменной хроматографии проводят обычно на синтетических смолах - катионитах, представляющих собой сополимеры стирола. Роль ионогенных группировок в них играют сульфогруппы ($-\text{SO}_3\text{H}$). Такие смолы являются сильными электролитами и диссоциируют на $-\text{SO}_3^-$ - ионы, прочно связанные со смолой и противоионы H^+ , переходящие в раствор.

Разделение аминокислот на колонках в настоящее время проводят автоматически в специальных приборах, называемых анализаторами аминокис-

лот. Погрешность достигает 0,1 %. Для работы на этих анализаторах требуется 0,3 – 1 мг белка.

5.6 Хроматография в тонком слое

Хроматография в тонком слое (ХТС) - один из простейших методов хроматографического анализа. Компоненты исследуемого раствора перемещаются в тонком слое сорбента, нанесённого на стеклянную пластину и покрытого жидкой фазой.

Пять стеклянных пластин (20×20см) толщиной не менее 4мм укладывают последовательно на поверхности стола без промежутков. Перед нанесением сорбента стеклянные пластины тщательно моют, обезжиривают и сушат.

В качестве сорбентов при тонкослойной хроматографии используют силикагель или крахмал, порошок целлюлозы, оксид алюминия, сефадекс и др. Сорбент растирают с водой до сметанообразного состояния, затем наносят тонким слоем на стеклянные пластины. Слой сорбента сушат в сушильном шкафу при 10 °С в течение 30 минут. Исследуемое вещество наносят пипеткой (за один приём 5мм³) пипеткой вместимостью 10мм³ с делениями 1мм³. Лучше в одну точку наносить образец несколько раз.



Рисунок 5.2 – Выполнение операций в ионообменной хроматографии

Затем на расстоянии 1 см от края наносят эталонную смесь из красителей (масляный желтый, судан желтый). Для последующего разделения пластины устанавливают в гнезда герметически закрывающихся камер. На дне камер имеются кюветы с растворителями, в которые погружают пластину на глубину 5 мм. Разделение проводят при 18-20 °С в темном помещении. Хроматограммы проявляют, разбрызгивая из тонкой форсунки специальные реактивы, высушивают и выявляют вещества.

Тонкослойная хроматография имеет ряд преимуществ по сравнению с хроматографией на бумаге: она отличается быстротой разделения (30-60 минут), большей чувствительностью метода (примерно в 10 раз).

В настоящее время разделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии проводят на пластинках, покрытых тонким слоем ионообменной смолы или ионообменной целлюлозой. Они выпускаются промышленностью или могут быть приготовлены непосредственно в лаборатории. Пластинки могут быть использованы для разделения аминокислот, олигопептидов, аминов и др.

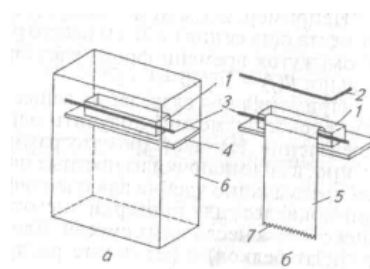
5.7 Метод хроматографического разделения на бумаге

Метод основан на различной растворимости разделяемых веществ в двух мало смешивающихся жидкостях, одна из которых удерживается бумагой, а другая неподвижна. Неподвижной фазой служат полосы фильтровальной бумаги, которые, будучи помещенными во влажную камеру, удерживают до 20-22 % влаги, оставаясь внешне сухими. В качестве подвижной фазы обычно используют органический растворитель, насыщенный влагой. Чем больше растворимость аминокислот или пептидов в неподвижной фазе, тем медленнее они движутся при продвижении органического растворителя по бумаге и наоборот.

Бумажная хроматография подразделяется на одномерную, двухмерную и круговую.

Одномерная хроматография заключается в том, что на полоску хроматографической бумаги шириной 1-5 см и длиной 20-70 см наносят исследуемый раствор (0,005-0,007 см³) на расстоянии нескольких сантиметров от верхнего края бумаги, который погружают в растворитель (хроматограмма нисходящая), или исследуемый раствор наносят на расстоянии нескольких сантиметров от нижнего края бумаги, который погружают в ванночку с растворителем, а верхний конец закрепляют (хроматография восходящая).

При нисходящей хроматографии (рисунок 5.3) лист бумаги подвешивают к камере, погрузив верхний край в кювету с элюентом. Под действием силы тяжести и капиллярных сил растворитель продвигается сверху вниз и по достижении края листа стекает на дно камеры. Чтобы поток был равномерным, нижний край листа нарезают зубцами.



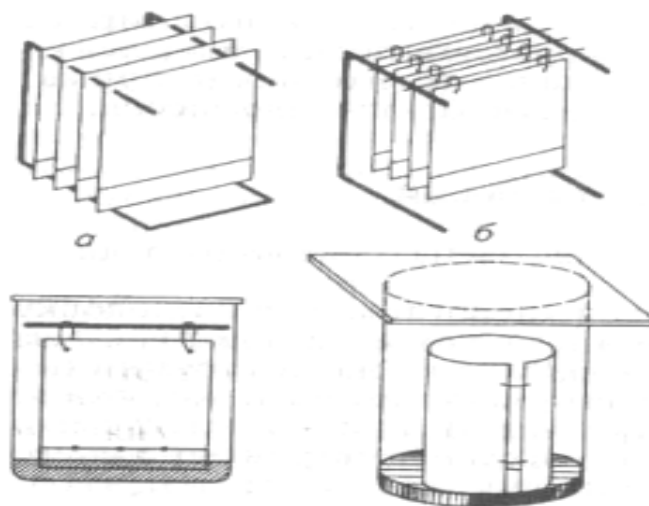
а – общий вид камеры; б – расположение листа бумаги; 1 – кюветы для элюента; 2 – стеклянная палочка для фиксации листа бумаги в лодочке; 3 - анти-сифонная палочка; 4 – подставка; 5 – лист бумаги; 6 – камера; 7 – зубцы на бумаге

Рисунок 5.3 – Камера для нисходящей хроматографии

Восходящую хроматограмму (рисунок 5.4) из-за слабой механической прочности бумаги подвешивают на специальных держателях. Растворитель поднимается до верхнего края листа бумаги за счёт капиллярных сил.

Для стандартизации результатов одновременно хроматографируют контрольную смесь.

Как только растворитель достигает намеченного рубежа, лист извлекают из камеры, отмечают положение фронта растворителя и высушивают. Поскольку большинство веществ лишено окраски, их положение на хроматограмме выявляют подходящим способом. Например, вещества, несущие радиоактивную метку, выявляют при помощи счётчиков импульсов; вещества, имеющие собственную флуоресценцию, выявляют при облучении УФ-светом (365нм). Остальные вещества обычно обнаруживают по окрашенным продуктам, которые образуются под действием специфических реагентов. Так, аминокислоты и полипептиды образуют с нингидрином хромофор, имеющий фиолетовую окраску.

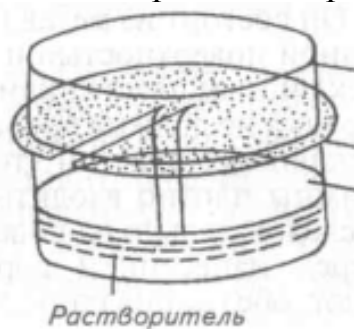


а, б – способы фиксации бумаги в держателе; в, г – способы размещения бумаги в камере

Рисунок 5.4 – Выполнение восходящей хроматографии

При двухмерной хроматографии последовательно пропускают через хроматографическую бумагу, содержащую разделяемое вещество, двух различных растворителей в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

Для бумажной хроматографии пригодны также круглые фильтры, на которых растворитель продвигается от середины к краям (рисунок 5.5).



1 – фильтр; 2 – стеклянные чашки

Рисунок 5.5 – Прибор для круговой хроматографии

5.8 Афинная хроматография

Афинная хроматография основана на установлении обратимых молекулярных взаимодействий, присущих биологически активным веществам. Этой способностью обладают иммунные, ферментные и гормональные системы; белки, которые могут переносить различные малые молекулы (витамины, жирные кислоты и др.) после связывания этих молекул за счёт сходства, и нуклеиновые кислоты, способные соединяться между собой или с некоторыми белками.

В афинной хроматографии используют нерастворимый носитель, на котором прикрепляется соединение, называемое лигандом. Он особым образом связывает подлежащий очистке продукт, находящийся в подвижной обычно жидкой фазе. Лиганд удерживается за счёт ковалентных связей, иногда пользуются ионным обменом, адсорбцией и др.

Афинная хроматография - разновидность адсорбционной, при которой связывание происходит в соответствии со специфическими свойствами двух молекул. Она основана на разных взаимодействиях: ионных, водородных, гидрофобных и других в зависимости от конформации и размера молекул.

Методы хроматографии основываются на всех возможных различиях молекул.

Афинную хроматографию проводят в водных буферных растворах, подбирая оптимальные условия для каждого конкретного случая.

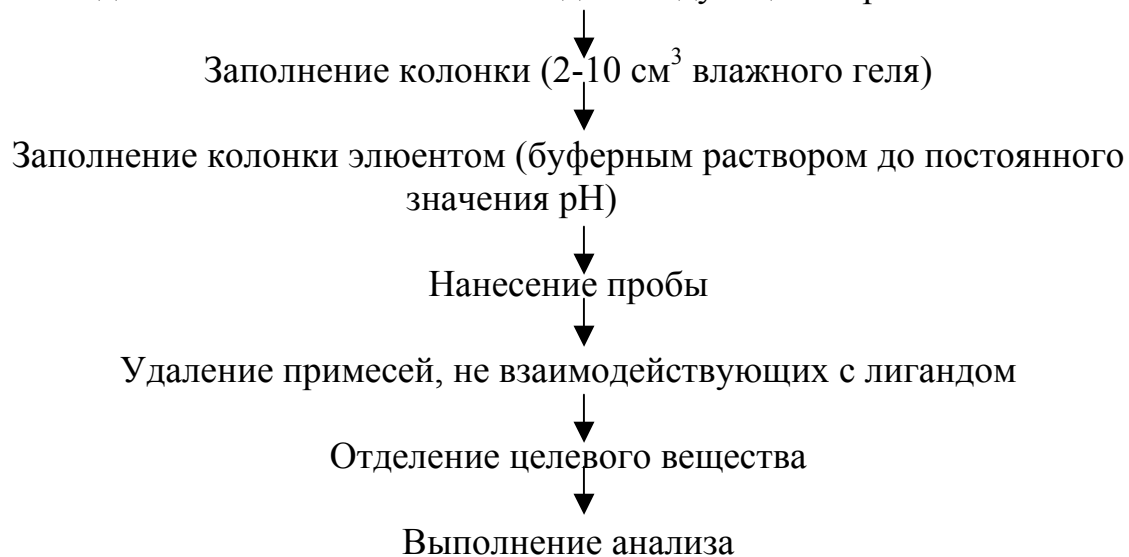
Лиганды - вещества, ковалентно связанные с нерастворимым носителем (матрицей). Лиганд фиксирован на матрице, целевое вещество связывается с лигандом и извлекается из раствора.

Схематично механизм разделения в афинной хроматографии представлен на рисунке 5.5.

Лиганд L – фиксирован на матрице, целевое вещество S связывается с лигандом и извлекается из раствора.

Взаимодействие (вещество-лиганд) должно быть специфическим и обратимым.

Последовательность анализа выглядит следующим образом:



6 Электрофоретические методы

6.1 Электрофорез

Электрофорез – метод разделения веществ, основанный на явлении миграции заряженных микрочастиц в жидкой среде под действием внешнего электрического поля.

Существует три различных электрофоретических метода (схема 6.1). Под собственно электрофорезом обычно понимают зональный электрофорез (ЗЭ), два других называют методами изоэлектрофокусирования (ИЭФ) и изотахофореза (ИТФ).

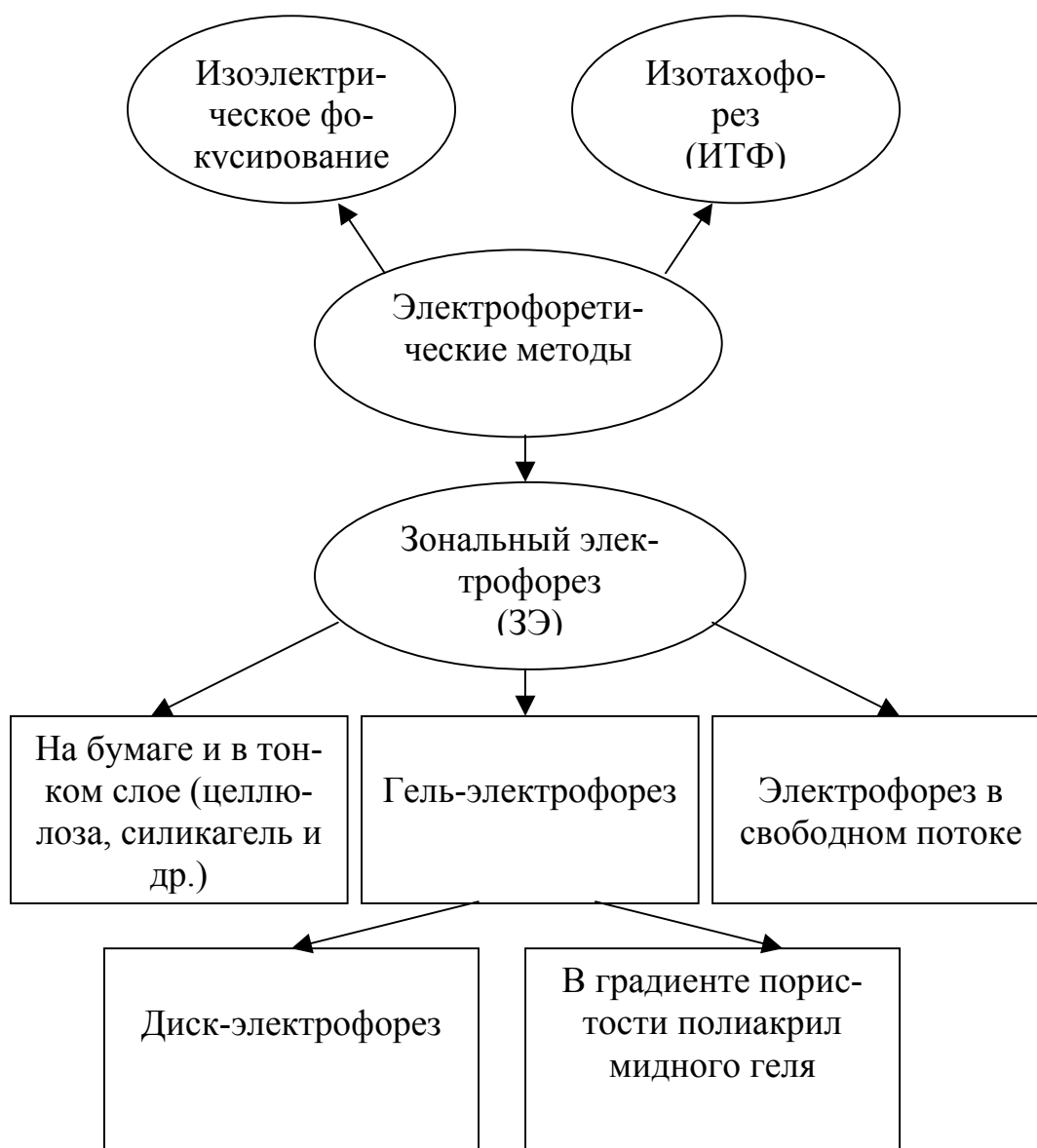


Схема 6.1 – Электрофоретические методы

Электрофорез применяют для разделения веществ, молекулы которых различаются по электрофоретической подвижности, т.е. отношению скорости электрофореза (скорости перемещения заряженных частиц вещества) к напряжённости электрического поля. Путём изменения внешних условий (на-

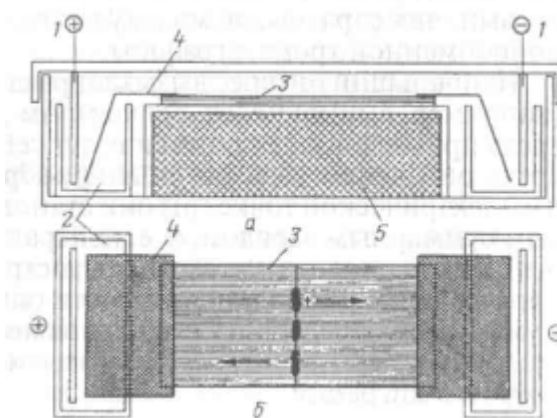
пример, рН среды, температуры, силы тока, концентрации буферного раствора) создают подходящие условия для разделения. Электрофорез считают "мягким" методом и поэтому часто применяют для работы с лабильными веществами.

Электрофорез можно проводить в растворе.

6.2 Зональный электрофорез

Зональный электрофорез (ЗЭ) – это метод разделения заряженных частиц в электрическом поле, основанный на том, что частицы с различными соотношениями заряд/масса мигрируют с различными скоростями.

В зависимости от знака заряда молекулы веществ мигрируют в электрическом поле по направлению к аноду или катоду (рисунок 6.1).



а – вид сбоку; б – вид сверху; 1 – электроды (анод и катод); 2 – буферный раствор в кювете; 3 – слой геля на пластинке (в центре пластинки показаны стартовые зоны анализируемой смеси); 4 – мостики из фильтровальной бумаги; 5 – охлаждаемая проточной водой металлическая пластина для отвода избыточной теплоты

Рисунок 6.1 – Камера для зонального электрофореза

Результаты этого процесса регистрируются на электрофореграмме. ЗЭ обычно проводят на бумаге, пластинках и в гелях в водных буферных растворах.

При электрофорезе в электродных камерах, электроды располагают так, чтобы они не касались носителя, а контакт между ними осуществлялся при помощи полосок фильтровальной бумаги.

Электродные камеры разделены на два отсека, которые соединяются дополнительными мостиками из фильтровальной бумаги. Перекачивая буфер насосом от анода к катоду, поддерживают постоянными концентрацию и значение рН буфера в двухкамерной системе.

Материалы-носители подразделяют на две группы:

- **первая** – бумага, целлюлоза, ацетилованная целлюлоза, агароза и материалы для ТСХ (например, силикагель);
- **вторая** – крахмал и полиакриламид.

Эффективность разделения зависит не только от суммарного заряда молекул анализируемых веществ, но и от размеров молекул. Определяющим параметром является соотношение заряд – масса.

Носители первой группы относительно инертны и слабо влияют на эффективность разделения. Материалы второй группы обладают пористой структурой, что существенно влияет на качество разделения. Поскольку размеры пор соизмеримы с размером макромолекул, то можно разделять вещества с одинаковыми суммарными зарядами, но с разными молекулярными массами.

Наибольший интерес вызывает разделение амфотерных веществ (например, аминокислот, белков). Амфотерные вещества в кислой среде присоединяют протон и ведут себя как катионы. В щелочной среде они приобретают свойства анионов. В изоэлектрической точке (pI) они становятся нейтральными молекулами. Суммарный заряд таких веществ зависит от рН среды в широком диапазоне. При электрофорезе они могут менять направление и скорость миграции.

Чем выше концентрация буферного электролита, тем меньше электрофоретическая подвижность разделяемых веществ.

Если два материала-носителя, в данном случае целлюлоза и вода, с различными диэлектрическими свойствами вступают в контакт, то они приобретают полярные заряды. В электрическом поле молекулы воды медленно мигрируют к катоду, а вместе с ними увлекаются все растворённые вещества. С некоторыми допущениями считают, что все отрицательно заряженные ионы также смещаются к катоду, т.е. движутся в "неправильном" направлении. При определении абсолютной электрофоретической подвижности вещества вместе с образцом вносят нейтральные соединения, например мочевины или глюкозу. По завершении электрофореза зону нейтрального соединения принимают за "истинную" стартовую линию. Явление переноса нейтральных веществ в электрическом поле называют электроосмосом.

В зависимости от типа электрофореза используют источник питания с регулируемым напряжением до 500В, но чаще – до 1200 В.

6.3 Электрофорез на бумаге и в тонком слое

Электрофорез на бумаге позволяет экстрагировать вещества из соответствующих зон или пятен и использовать для дальнейшей работы; обнаруживать вещества, используемые в бумажной хроматографии; проводить фракционирование в двух направлениях.

Для электрофореза на бумаге используют специальные сорта бумаги, со следующими свойствами: достаточной механической прочностью; удовлетворительным удерживанием достаточного количества электролита и образца.

Камера для высоковольтного электрофореза на бумаге по Михлю является практической и удобной. В такой камере проводят электрофорез при напряжении до 3кВ и силе тока до 200 мА. В качестве теплоносителя и изо-

лирующей среды в камеру помещают гептан, толуол, хлорбензол. Так как эти растворители токсичны и горючи, необходимо соблюдать меры противопожарной безопасности – размещать стеклянные камеры только в вытяжном шкафу в поддоне достаточной вместимости.

Электрофорез в тонком слое проводят на стеклянных пластинках, покрытых слоем носителя. По сравнению с полосками бумаги пластины более удобны в обращении.

Для проведения электрофореза в тонком слое используют прибор с охлаждаемыми пластинами, аналогичный прибору, изображённому на рисунке 6.1.

Наиболее часто используют готовые пластины размерами 10×20 и 20×20 см, покрытые силикагелем, кизельгуром, целлюлозой (аналогично пластинам для тонкослойной хроматографии). При проведении электрофореза в тонком слое предпочтительней использовать летучие буферы (смеси из муравьиной и уксусной кислот, аммиака, пиридина, триэтиламина в разных соотношениях и сочетаниях).

Исследуемые образцы многократно (увеличивается нагрузка на стартовую зону) наносят капилляром на сухую пластину в виде пятна диаметром не более 12мм. Между нанесениями образца растворитель выпаривают при помощи фена, избегая перегрева. Пластины равномерно опрыскивают рабочим буфером из пульверизатора до почти прозрачного состояния (влажная пластина должна иметь вид матового стекла). Затем устанавливают электродные мостики. Прибор накрывают крышкой, включают охлаждение и проводят электрофорез при напряжении 900–1000 В в течение 15 мин. Пластины быстро высушивают и обрабатывают соответствующим проявителем.

Электрофорез на бумаге и в тонком слое применяют для исследования фракций, полученных при колоночной хроматографии, для разделения аминов, аминокислот, пептидов и белков, нуклеотидов, фенолов, красителей, неорганических соединений.

6.4 Гель-электрофорез

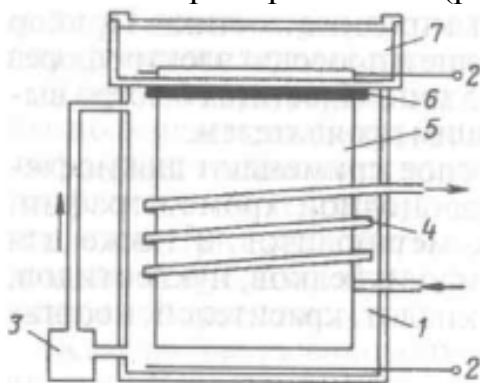
Вместо целлюлозы и силикагеля можно использовать мягкие гели. Ниже приведены основные рабочие стадии проведения электрофореза в слое геля: приготовление гелей и подготовка образца → электрофоретическое разделение → детектирование → анализ результатов и оформление их в рабочем журнале.

Из множества гелей на практике применяют только два – гели агарозы и полиакриламида. С помощью агарозы можно анализировать сложные биополимеры, например ферментные комплексы, липопротеиды, ДНК и РНК. Несмотря на небольшую концентрацию агарозы (не более 0,2 %), необходимую для получения крупнопористого геля, гели агарозы характеризуются достаточно высокой механической прочностью.

В зависимости от способа приготовления геля и типа буферной системы различают несколько вариантов метода:

- электрофорез в геле полиакриламида (ПААГ);
- диск-электрофорез (диск-ПААГ) в прерывистой буферной системе;
- электрофорез в геле полиакриламида в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ);
- электрофорез в градиенте пористого полиакриламидного геля.

Электрофорез в геле полиакриламида используют для эффективного разделения и идентификации биополимеров (полипептидов белков, нуклеиновых кислот). Гель формируют в виде блоков или столбиков, которые располагают в электрофоретической камере вертикально (рисунок 6.2).



1 – камера; 2 – электроды; 3 – перестатический насос; 4 – змеевик для подачи теплоносителя (хладагента); 5 – слой геля между двумя стеклянными пластинками; 6 – изолирующая прокладка; 7 верхняя электродная камера

Рисунок 6.2 – Камера для электрофореза в вертикальном блоке геля

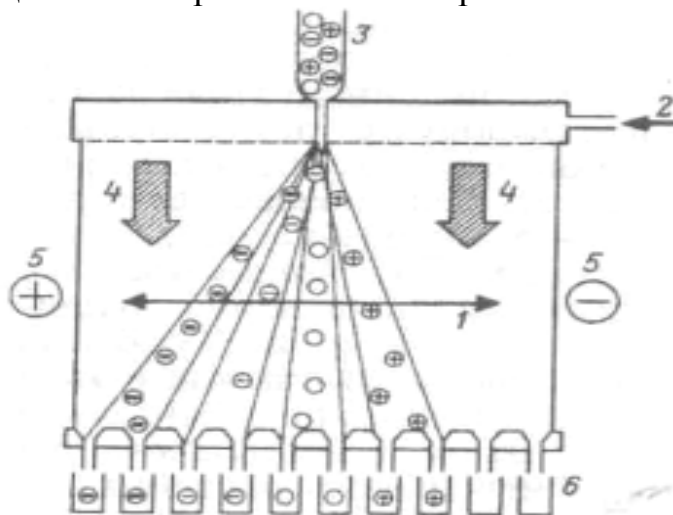
Гель-электрофорез применяют для разделения всех классов заряженных веществ, например белков, ферментных комплексов, вирусов, олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот; определения молекулярных масс биополимеров; анализа белков на микроуровне (антигенов при количественном иммуноэлектрофорезе).

6.5 Электрофорез в свободном потоке

При электрофорезе в свободном потоке электролит (буфер) перемещается в вертикальном направлении (перпендикулярно направлению электрического поля). Заряженные частицы под действием электрического поля мигрируют в горизонтальном направлении и одновременно увлекаются потоком буфера. В итоге разделённые вещества распределяются в потоке в соответствии с их электрофоретической подвижностью и элюируются из прибора в различных фракциях.

В основе метода лежат те же принципы, что и для непрерывного зонального электрофореза, однако здесь поток электролита передвигается перпендикулярно электрическому полю (рисунок 6.3). Зоны стабилизируются при помощи потока достаточно разбавленного электролита.

Электрофорез в свободном потоке проводят в приборе Ханнига. Смесь разделяемых веществ и рабочий буфер непрерывно подают в верхнюю часть камеры между двумя охлаждаемыми стеклянными пластинами, расстояние между которыми 0,6мм. Компоненты смеси мигрируют под действием электрического поля в соответствии с их суммарным зарядом в направлении электродов. Одновременно они передвигаются под действием потока электролита в направлении сверху вниз. В нижней части поток разделяется на 48 отдельных потоков. В стандартных условиях компоненты смеси элюируются в одних и тех же зонах, поэтому можно работать в непрерывном режиме, накапливая вещества в сборниках коллектора.



1 – градиент электрического поля; 2 – буферный раствор; 3 – разделяемая смесь; 4 – направление потока электролита; 5 – электрод; 6 – коллектор для сбора фракций

Рисунок 6.3 – Электрофорез в свободном потоке:

Электрофорез в свободном потоке применяют для препаративного разделения заряженных частиц, в том числе коллоидных, субклеточных частиц и клеток.

6.6 Изоэлектрическое фокусирование

С помощью изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) по изоэлектрическим точкам (ИЭТ) разделяют амфотерные вещества, в частности белки. Сущность метода заключается в том, что молекулы белков мигрируют под действием электрического поля в среде достижения области рН, соответствующей их ИЭТ.

Изоэлектрическое фокусирование отличается от зонального электрофореза тем, что разделение осуществляется не в буфере с постоянным значением рН, а в среде с линейным градиентом рН. Значение рН минимально вблизи анода, максимально – вблизи катода.

В области высоких значений рН аминокислоты и белки заряжены отрицательно и мигрируют в электрическом поле в направлении к аноду, т.е. в

область низких значений рН. В этой области молекулы белка перезаряжаются за счёт протонирования, вследствие чего направление движения изменяется на противоположное. В конечном счете, молекулы попадают в область, где их суммарный заряд равен нулю, вследствие чего они утрачивают электрофоретическую подвижность. Молекулы, находившиеся в начале процесса в кислой области (низкие значения рН), мигрируют по направлению к катоду. При повышении рН среды они также попадают в зону, где утрачивают заряд и электрофоретическую подвижность. Когда же молекулы белков покидают область ИЭТ вследствие диффузии, они вновь приобретают заряд и начинают передвигаться под действием электрического поля до достижения ими прежнего положения. Чем выше напряжённость поля, тем меньше влияние диффузии, тем уже зоны разделяемых веществ.

При отсутствии информации о значениях изоэлектрических точек белков разделение проводят в широком диапазоне значений рН – от 2 до 11, не ставя задачу достижения высокой степени разрешения. Таким образом, определяют pI отдельных компонентов смеси. Затем в зависимости от распределения изоэлектрических точек выбирают минимальный диапазон рН для последующего опыта. При благоприятных обстоятельствах удаётся разделять вещества с разницей в значениях pI около 0,01.

ИЭФ применяют для аналитического разделения (мкг) пептидов, белков, нуклеотидов, органических кислот, ионов металлов и препаративного разделения белков (г); накопления следовых количеств веществ (мкг) из больших объёмов пробы; определения электрофоретической подвижности.

7 Эбулиоскопия, криоскопия и реология

7.1 Эбулиоскопия и криоскопия

Методы эбулиоскопии и криоскопии основаны на измерении повышения точки кипения и соответственно понижения точки замерзания раствора анализируемого вещества по сравнению с чистым растворителем. Оба явления объясняются понижением давления пара раствора относительно чистого растворителя.

Повышение температуры кипения и понижение температуры замерзания растворов зависят от концентрации (так называемые коллигативные эффекты).

Эбулиоскопическая K_b и криоскопическая K_f постоянные равны соответственно повышению точки кипения и понижению точки замерзания раствора, содержащего 1 моль вещества, т.е. $6,02 \cdot 10^{23}$ недиссоциированных частиц в 1 кг растворителя. Точки кипения и замерзания наиболее часто применяемых растворителей, а также молярные постоянные приведены в таблице 7.1.

Таблица 7.1 – Криоскопические и эбулиоскопические постоянные некоторых растворителей

Растворитель	Температура плавления, °С	Температура кипения, °С	K_b	K_f
			°С/(моль · кг)	
Вода	0	100	1,86	0,52
Ледяная уксусная	17	118	3,90	3,07
Диоксан	12	102	4,80	3,45
Хлороформ	-	61	4,98	3,80
Бензол	5	80	5,49	2,64
Фенол	41	181	7,30	3,60
Камфора	179	204	40	6

Криоскопию чаще, чем эбулиоскопию, применяют для определения молекулярной массы, вследствие более высоких значений криоскопических постоянных по сравнению с эбулиоскопическими, а также более простых конструкций приборов для криоскопии.

Концентрацию растворов макромолекул, например растворов биологически активных веществ, характеризуют осмоляльностью или осмолярностью, т.е. отношением количества растворённых частиц к 1 кг воды (моль/кг) или к 1 л раствора (моль/л) соответственно. Несмотря на незначительное различие между обеими величинами, чаще используют осмоляльность, так как в этом случае учитывается уменьшение объёма раствора за счёт макромолекул.

Большинство криоскопических приборов работает следующим образом: образец (около 2 см³) помещают в охлаждающую смесь и охлаждают до определённой заранее температуры (на 5–7 °С ниже точки замерзания). Затем вызывают мгновенную кристаллизацию при помощи быстрого и эффективного перемешивания. На графике зависимости температуры от времени мо-

менту кристаллизации растворителя соответствует плато, а моменту кристаллизации раствора – точка перегиба. Температуру, соответствующую точке перегиба, используют при расчётах.

8 Реология

8.1 Реологические методы исследований

Реология как наука о течении и деформации реальных тел изучает их поведение при механическом нагружении. Под действием внешней нагрузки в любом продукте возникают деформации и напряжения, которые зависят от состава и строения выбранных объектов исследования, являясь мерой сил внутреннего взаимодействия между элементами их структуры.

По виду механических нагружений и вызываемых ими деформаций можно классифицировать основные реологические свойства: сдвиговые свойства, проявляющиеся при воздействии касательных напряжений; компрессионные – при воздействии нормальных напряжений и поверхностные – при сдвиге или отрыве продукта от твёрдой поверхности.

Свойства можно описать множеством структурно-механических характеристик: сдвиговые – коэффициентами динамической (ньютоновской), эффективной и пластической вязкости, предельным напряжением сдвига, индексом течения и др.; компрессионные – модулями упругости и пластичности, различными прочностными характеристиками и параметрами текстуры; поверхностные – адгезионными и когезионными характеристиками и коэффициентами внешнего трения.

Структурно-механические характеристики (СМХ) используют для оценки консистенции продукта как одного из основных показателей его качества. Оценка консистенции продукта осуществляется либо путём измерения СМХ на специальных приборах (реометрах), либо путём сенсорной (органолептической) оценки, т.е. субъективной оценки сопротивляемости и деформации продукта.

Сенсорная оценка консистенции, которую можно характеризовать как эмпирическую характеристику деформационного поведения продукта, была известна до широкого применения реологического анализа и используется до настоящего времени. Однако результаты сенсорной оценки зависят от квалификации дегустатора, тщательности проведения контроля с условием выполнения определённых правил, гарантирующих точность и воспроизводимость результатов, и при отсутствии специально подобранных и обученных экспертов, часто носят субъективный характер.

Оценку консистенции продукта инструментальными методами (измеряя его СМХ) проводят следующим образом:

- 1) в зависимости от видов и интенсивности механического воздействия (нагружения во времени) определяют различные СМХ, из которых выбирают наиболее чувствительную к изменению структуры продукта при его деформации. Выбранная СМХ является реологическим показателем консистенции (измеряемой величиной) для данного продукта;

- 2) предварительно проводят определение "эталонного" значения СМХ для каждого вида продукта по существующим методикам оценки качества

продукта. При этом в качестве "эталонного" принимают значение СМХ продукта высшего качества;

3) сравнивают величину выбранного реологического показателя для исследуемого образца продукта с "эталонным" для него значением СМХ и по их разности судят о консистенции продукта.

В зависимости от поставленной задачи полученные результаты могут быть использованы для определения качества готового продукта, регулирования параметров технологического процесса производства, служить исходными данными при конструировании технологического оборудования и т.п.

В молочной промышленности вырабатывают широкий ассортимент продуктов, которые по своей структуре представляют собой различные реологические тела – от упруго-пластичных твёрдых тел до истинно-вязких (ньютоновских) жидкостей.

8.2 Сырьё и молочные продукты как реологические тела

Молочные продукты, включая сырьё и полуфабрикаты, в зависимости от состава, дисперсного строения и структуры обладают различными реологическими свойствами и текстурными отличительными признаками.

Так как не всегда при определённом виде деформации тела одновременно проявляются все его реологические свойства, то для полной количественной оценки реологических свойств тела необходимо применять различные методы нагружения. Инструментальное определение реологических констант требует правильного выбора методов измерений и приборов (реометров).

Под действием внешней нагрузки в теле возникают деформации и напряжения, являющиеся мерой сил внутреннего взаимодействия между элементами тела, взаимосвязь между которыми описывается посредством реологических констант (коэффициентов уравнений деформации и течения) – различных структурно-механических характеристик.

Некоторые физико-механические свойства материалов. Твёрдость – это комплексное свойство тел оказывать сопротивление проникновению другого, более твёрдого тела вследствие необратимых (упругой и вязкой) деформаций.

Твёрдость нельзя выразить как физическую величину с однозначной размерностью. Она представляет собой технический параметр, который выражается в относительных величинах в зависимости от метода измерений.

Коэффициент твёрдости рассчитывают по величине силы и геометрическим параметрам остаточной деформации (площади шарового сегмента и т.п., глубине внедрения).

Мягкость – свойство, противоположное твёрдости.

Хрупкость – свойство твёрдых тел достигать разрушения без пластичной деформации. У тел хрупкое разрушение наступает только при высо-

ких скоростях деформации или низких температурах, когда теряют действие вязкостные свойства.

Когезия – сопротивление тела разрушению, связанному с преодолением сил взаимодействия между атомами и молекулами на поверхности раздела.

Адгезия – свойство, которое основывается на взаимодействии двух различных тел на границе раздела фаз и вызывает сцепление тел. При разделении тел необходимо преодолеть силы сцепления. Прочность соединения двух тел из различных материалов зависит от площади и состояния поверхности контакта между ними.

Липкость – свойство пограничного слоя вязких или пластичных материалов оказывать сопротивление разделению находящихся в контакте поверхностей. Оно основывается на адгезии материалов на поверхности раздела и когезии самого материала.

Внешнее трение – сопротивление относительному перемещению двух находящихся в соприкосновении поверхностей твёрдых тел. Для начала скольжения необходимо приложить нагрузку, превышающую силы трения покоя.

Консистенция – степень плотности (твёрдости) продукта. В зависимости от консистенции продукты по-разному деформируются при избранных видах нагрузки и скорости. Результаты измерений обычно дают в относительных единицах, характерных для применяемых наиболее часто приборов (консисометров), имеющих упрощённую конструкцию.

На основе реометрического анализа при использовании более сложных приборов деформационные свойства материала, связанные с консистенцией, можно достаточно полно описать реологическими характеристиками или уравнениями состояния.

Текстура, по определению профессора М.Боурна, – физико-структурные свойства вещества, в частности продукта, воспринимаемые органами слуха, зрения и осязания и вызывающие у человека определённые ощущения при потреблении (откусывании, разжёвывании, проглатывании). Комплекс ощущений при потреблении пищи, который называется органолептическим, приводит потребителя к предпочтению одних или отказу от других пищевых продуктов. Для создания высококачественных пищевых продуктов необходимо целенаправленно влиять на их органолептические свойства.

Консистенция и вязкость относятся к текстуре и представляют собой два из множества возможных её отличительных признаков (схема 8.1).



Схема 8.1 – Классификация сенсорной оценки качества и текстуры пищевых продуктов по М.Боурну

При анализе текстуры определяют кинестетические признаки продукта, связанные с мышечными ощущениями.

Инструментальные измерительные методы для определения отдельных кинестетических признаков можно разделить на три группы:

- методы точного измерения реологических величин – коэффициента вязкости, предела текучести, модуля упругости, прочности на растяжение и др.;

- эмпирические методы, при которых продукты подвергают воспроизводимой деформации при нагрузке при помощи измерительных приборов, не позволяющих точно определить реологические свойства. Результаты измерений представляют собой параметры консистенции. Они хорошо коррелируют с признаками текстуры полученными при органолептической оценке;

- имитационные методы, при которых пищевые продукты в специальных измерительных приборах подвергают испытаниям, имитирующим реальные нагрузки при приёме пищи, например с помощью циклических на-

грузок имитируется процесс разжёвывания пробы. Цель такого анализа текстуры – измерение параметров, которые соответствуют признакам текстуры продукта, полученным сенсорными методами.

8.3 Методы измерений и измерительные приборы

Для экспериментального определения реологических параметров продуктов или текстурных показателей консистенции существует множество методов, которые различаются по области применения (лабораторные и производственные), виду измеряемой величины (например, реологические характеристики продукта и показатели его консистенции), принципам нагружения, степени автоматизации и др.

Для практического выбора метода измерения учитывают необходимое количество проб, точность и продолжительность измерений и другие факторы, которые зависят от конкретных конструктивных решений измерительного прибора.

Большое число реологических методов измерений предназначено для лабораторных исследований. Кроме лабораторных методов измерений для фундаментальных научных исследований реологических характеристик материалов (в том числе и специальных) с высокой точностью, для многократно повторяющихся исследований предпочтение отдаётся тем методам и приборам, которые позволяют провести измерения и обработку их результатов быстро и с минимальной зависимостью от субъективных факторов. Промышленностью ряда зарубежных стран выпускаются такие приборы, измерения на которых полностью автоматизированы с помощью компьютера, одновременно математически обрабатывающего исходные данные измерений в соответствии с выбранными моделями и уравнениями деформации и течения исследуемых продуктов, а также комплексные реологические лаборатории под названием "автоматизированное рабочее место реолога".

Эффективное и качественное управление процессами производства пищевых продуктов часто требует контроля реологических показателей в производственных условиях. Использование лабораторных методов при этом сопряжено с большими затратами времени и труда и возможно только для очень длительных процессов.

Методы измерений в производственном процессе требуют использования большей частью несложных принципов одномерного нагружения продукта (простой сдвиг, одноосное растяжение – сжатие и т.д.), охватывающих измерение конкретных показателей консистенции или характерных величин, которые связаны с выбранными реологическими свойствами.

Одномерное стационарное сдвиговое течение может быть реализовано при капиллярном, плоскопараллельном, цилиндрическом и торсионном течении.

Классификация применяемых приборов предназначенных для исследования описанных выше структурно-механических свойств и текстуры выпускаемых в молочной промышленности, представлены в таблицы 8.1.

Таблица 8.1 - Реометры, используемые для исследования молочных продуктов

Реометры	Вид нагружения (течения)	Измеряемая величина	Исследуемые продукты
Вискозиметры:			
капиллярные	Одномерное сдвиговое течение	Коэффициенты динамической эффективной и пластической вязкости, индекс течения, а также параметры текстуры	Молоко, сливки, пахта, сыворотка, кефир, простокваша, йогурт, сметана, творог, творожные изделия, сливочное масло, мороженое
ротационные	То же		
шариковые	Течение Стокса		
колебательные	Одномерное и двухмерное сдвиговое течение		
Пететрометры	Многомерное пенетрационное течение	Предельное напряжение сдвига, параметры текстуры	Творог, творожные изделия, сливочное масло, мороженое, сыр
Компрессионные приборы	Сжатие образца	Предел прочности при сжатии, объемная вязкость, модули упругости, периоды релаксации, параметры текстуры	Сливочное масло, мороженое, сыр
Универсальные приборы типа "Инстрон"	Растяжение, сжатие, изгиб, сдвиг и другие простейшие виды нагружения исследуемого продукта	Прочностные характеристики, параметры текстуры	То же
Трибомеры	Сдвиг	Фрикционные характеристики	Сыр
Адгезиометры	Отрыв контактирующего элемента от поверхности исследуемого материала	Адгезионные характеристики	Молоко, сливки, пахта, молочная сыворотка, кефир, простокваша, йогурт, сметана, творог, творожные изделия, сливочное масло, мороженое

Список использованных источников

1. **Антипова, Л.В.** Методы исследования мяса и мясных продуктов [Текст]: учебник / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, И.А. Рогов. – М.: Колос, 2001. – 570 с.
2. **Брусиловский, Л.П.** Инструментальные методы и экспресс анализаторы для контроля состава и качества молока и молочных продуктов. [Текст] / Л.П. Брусиловский – М.: Молочная промышленность, 1997. – 48 с.
3. **Геккелер, К.** Аналитические и препаративные лабораторные методы. [Текст] / К. Геккелер, Х. Экштайн; Пер. с нем. М.: Химия, 1994. – 416 с.
4. **Горбатов, А.В.** Реология мясных и молочных продуктов. [Текст] / А.В. Горбатов. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 383 с.
5. **Инихов, Г.С.** Методы анализа молока и молочных продуктов. [Текст] / Г.С. Инихов, Н.П. Брио. – М.: Пищевая промышленность, 1971. – 423 с.
6. **Крусь, Г.Н.** Методы исследования молока и молочных продуктов [Текст] / Г.Н. Крусь, А.М. Шалыгина, З.В. Волокитина; - под общ. ред. А.М. Шалыгиной. – М.: Колос С, 2002. – 368 с.
7. **Мачихин, Ю.А.** Инженерная реология пищевых материалов. [Текст] / Ю.А. Мачихин, С.А. Мачихин. – М.: Легкая пищевая промышленность, 1981. – 216 с.
8. **Макаров, Н.В.** Методы анализа состояния и защита окружающей среды в мясной и молочной промышленности. [Текст] / Н.В. Макаров и [др.] – М.: Агропромиздат, 1989. – 151 с.
9. Методы исследования молока и молочных продуктов. Литовский филиал ВНИИМСа и республиканского правления НТО пищевой промышленности. – М.: Агро НИИТЭИММП, 1988. – 173 с.
10. **Петрухин, О.М.** Практикум по физико-химическим методам анализа [Текст]: учебное пособие / под ред. О.М. Петрухина. – М.: Химия, 1987. – 248 с.
11. **Храмцов, А.Г.** Продукты из обезжиренного молока, пахты и молочной сыворотки [Текст] / под ред. А.Г. Храмцова, Н.Г. Нестеренко. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 296 с.
12. **Рогов, И.А.** Дисперсные системы мясных и молочных продуктов – М.: Агропромиздат, 1990. – 320 с.
13. **Горбатов, А.В.** Структурно-механические характеристики пищевых продуктов. [Текст] / под ред. А.В. Горбатова. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 296 с.
14. **Юинг, Г.** Инструментальные методы химического анализа [Текст] / Г. Юинг; пер. С англ. – М.: Мир, 1989. – 608 с.