

Н. Н. КРЫЛОВА, Ю. Н. ЛЯСКОВСКАЯ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОДУКТОВ
ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ



ПИЩЕПРОМИЗДАТ
Москва • 1961

В книге изложены физико-химические методы определения состава, качества и питательной ценности продуктов животного происхождения (мяса, жиров, колбасных изделий, молочных продуктов, органопрепаратов и др.).

В соответствии с этим освещены спектрофотометрические, хроматографические, полярографические, люминесцентные и другие методы исследования. Описаны используемые приборы и работа с ними. Приведен справочный материал.

Книга предназначена для работников экспериментальных и производственных лабораторий, занятых переработкой продуктов животного происхождения, инженеров и техников, технологов и химиков, мясоперерабатывающих предприятий.

ВВЕДЕНИЕ

Трудно переоценить то огромное научное и практическое значение, которое приобрели в настоящее время физико-химические методы исследования.

Современный уровень исследовательских работ во многих областях науки определяется применением таких методов анализа как спектрофотометрические, фотоэлектроколориметрические, хроматографические, полярографические, люминесцентные и др. Эти методы исключительно перспективны, но они еще недостаточно внедрены в повседневную практику отраслевых лабораторий.

Изучение химического состава и пищевой ценности сырья и продуктов, исследование биохимических процессов, протекающих в животном сырье на различных стадиях производства с целью эффективной организации выпуска полноценных высококачественных изделий, являются важными факторами в решении задачи удовлетворения все возрастающих потребностей населения в таких продуктах питания

Авторы сделали попытку обобщить известные по литературным источникам и в практике материалы по применению физико-химических методов исследования.

В книге описаны приборы и приемы, которыми приходится пользоваться в процессе применения физико-химических методов анализа. Все эти методы апробированы практикой отечественных и зарубежных исследователей. Большая часть описанных методов проверена и использована в практической работе авторами и сотрудниками лабораторий физико-химических исследований и технологии органолептических Всесоюзного научно-исследовательского института мясной промышленности.

ГЛАВА I

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ И ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Спектрофотометрические и фотоэлектроколориметрические методы анализа основаны на одних и тех же законах поглощения света исследуемым веществом. В ряде случаев эти виды анализа в той или иной степени взаимозаменяемы, вследствие чего они рассмотрены в одной главе. При фотоэлектроколориметрическом анализе используют более или менее широкую область спектра. Спектрофотометрический анализ проводят в монохроматическом свете.

СПЕКТРАЛЬНОЕ ПРОПУСКАНИЕ И ПОГЛОЩЕНИЕ

Абсорбционный анализ является одним из физических методов, применяемых в химии для количественного анализа, идентификации веществ, суждения об их строении, установления степени чистоты веществ и т. д. Спектрофотометрический анализ применяют для исследования в видимой, ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра [1].

Для проведения аналитической работы в химических и биохимических исследованиях широко используются спектры поглощения (абсорбционные спектры). Такие спектры образуются при пропускании излучения любого источника сквозь слой жидкости, газа или твердого вещества. При этом некоторые лучи могут быть избирательно поглощены, а непоглощенные лучи после прохождения через призму образуют спектр с определенными провалами, с пониженной интенсивностью излучения (полосы поглощения) [1, 2].

Каждое вещество имеет свой характерный спектр поглощения с определенным числом полос поглощения и с определенным их расположением. Существует зависимость между величиной поглощенной энергии и количеством поглощающих центров (атомов, молекул), благодаря которой возможен количественный анализ. Эта зависимость выражена двумя основными законами поглощения света, которые математически можно записать в двух формах: экспоненциальной и логарифмической. Один из них — закон Бугера — Ламберта — формулирует

ся следующим образом: относительное количество поглощенного пропускающей средой света не зависит от интенсивности падающего излучения; каждый последующий слой среды единичной толщины поглощает всегда одну и ту же часть проходящего через него света.

Если принять интенсивность света, падающего на любую пропускающую среду, равной единице, а каждый слой среды единичной толщины — поглощающим одну десятую часть падающего на него излучения, то интенсивность света при прохождении его через каждый последующий слой среды будет уменьшаться каждый раз на одну десятую величины: 1,0; 0,90, 0,81; 0,73, 0,66 и т.д.

Такая зависимость записывается в виде следующей формулы:

$$I = I_0 e^{-\alpha l}, \quad (I-1)$$

или

$$\ln \frac{I_0}{I} = \alpha l, \quad (I-1a)$$

где I_0 — интенсивность падающего светового потока;

I — интенсивность светового потока, прошедшего через поглощающую среду;

l — толщина слоя в см;

α — коэффициент поглощения среды.

Практически удобнее пользоваться десятичными логарифмами вместо натуральных, тогда коэффициент поглощения α надо заменить коэффициентом погашения света K . Уравнения (I-1) и (I-1a) примут следующий вид:

$$I = I_0 \cdot 10^{-Kl} \quad (I-2)$$

или

$$\lg \frac{I_0}{I} = Kl, \quad (I-2a)$$

где K — постоянная, зависящая только от природы исследуемой среды и длины волны падающего света.

Коэффициент погашения K является величиной, обратной толщине слоя, требующегося для ослабления интенсивности проходящего через него светового потока в 10 раз.

Другой закон — закон Бера — выражает влияние концентрации поглощающего вещества. Согласно этому закону поглощение света пропорционально числу молекул поглощающего вещества, через которое проходит световой поток.

Коэффициент погашения K пропорционален концентрации поглощающего вещества:

$$K = \varepsilon c, \quad (I-3)$$

где K — коэффициент погашения;

ε — коэффициент, не зависящий от концентрации;

c — концентрация вещества.

Если в уравнение (I—2) и (I—2а) подставить значение K из уравнения (I—3), то получится следующее выражение:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l} \quad (I-4)$$

или

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l. \quad (I-4a)$$

Уравнение (I—4) или (I—4а) объединяет законы Бугера — Ламберта—Бера, в нем есть все нужные для химического анализа величины, которые количественно выражают связь между поглощенным светом, концентрацией и толщиной слоя исследуемых поглощающих растворов, ими пользуются в большинстве случаев при применении спектрофотометрии и колориметрии в химии.

Так как количество поглощенного света не зависит от абсолютной интенсивности падающего света, а определяется только концентрацией вещества в растворе и толщиной слоя раствора, при спектрофотометрических измерениях можно не интересоваться абсолютной величиной поглощенного света, а принимать во внимание только относительные величины.

Молярный коэффициент погашения представляет собой постоянную величину для каждого вещества, зависящую от его природы, длины волны падающего света и температуры раствора. Численное значение величины для различных веществ колеблется в очень широких пределах примерно от 500 до 200 000 [5].

Когда молекулярный вес поглощающего вещества неизвестен, для сравнения интенсивностей поглощения часто пользуются символом $E_{1\text{см}}^{1\%}$. Он связан с молярным коэффициентом погашения ε (или $E_{1\text{см}}^{\text{моль}}$)

$$E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot \frac{M}{10} = \varepsilon, \quad (I-5)$$

где M — молекулярный вес поглощающего вещества.

Для любого данного растворенного вещества величина $E_{1\text{см}}^{1\%}$ будет постоянной только при совершенно определенной

длине волны и при одном и том же растворителе. Если при данной длине волны и данном растворителе величина $E_{1\text{см}}^{1\%}$ известна для чистого вещества, то процентное содержание поглощающего вещества в любом исследуемом образце прямо пропорционально наблюдаемой величине

$$\frac{100 E_{1\text{см}}^{1\%} (\text{наблюдаемая})}{E_{1\text{см}}^{1\%} (\text{чистое вещество})} =$$

$= \%$ поглощающего вещества в растворе.

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ представляет собой оптическую плотность однопроцентного раствора при толщине слоя 1 см.

Путем преобразования выражения (I—4) можно вывести значения некоторых фотометрических величин, с которыми обычно приходится иметь дело в спектрофотометрии и колориметрии.

Прозрачностью, или пропусканием (T), называют отношение интенсивности светового потока I , прошедшего через раствор, к интенсивности светового потока I_0 , падающего на раствор, т. е.

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon cl}. \quad (\text{I—6})$$

Величина T для слоя толщиной 1 см называется коэффициентом пропускания. Коэффициент пропускания меняется в пределах от 1 до 0 или от 100 до 0%

Оптической плотностью D , или поглощением (экстинкцией) E , называют логарифм величины обратной пропусканию или логарифм отношения интенсивности светового потока I_0 , падающего на раствор, к интенсивности светового потока I , прошедшего через раствор.

$$D = E = \lg \frac{1}{T} = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon cl = Kl. \quad (\text{I—7})$$

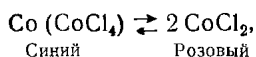
Оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации вещества в растворе.

Во всех изученных до сего времени случаях закон Бугера—Ламберта остается справедливым [1]. Закон Бера имеет много исключений. Особенно часто он нарушается при больших концентрациях вещества в растворе.

Отклонения от закона Бера происходят по ряду причин. Так, если окрашенное соединение диссоциирует в растворе, то воз-

можны случаи, когда ионы будут бесцветны или окраска их будет отличаться от окраски молекулы. Например, концентрированный раствор хлорной меди имеет зеленую окраску, зависящую от присутствия молекул CuCl_2 ; разбавленный же раствор этого соединения окрашен в голубой цвет, зависящий от присутствия ионов Cu^{++} . В растворе пикриновой кислоты интенсивная желтая окраска обусловлена ионом этой кислоты, молекулярная форма почти бесцветна.

Часто не подчиняются закону Бера вещества, способные образовывать комплексы в концентрированных растворах. С разбавлением раствора комплексообразование понижается, изменяется окраска раствора, а следовательно, и спектр поглощения. Классическим примером влияния комплексообразования на окраску служат растворы хлористого кобальта. Концентрированный раствор этого вещества окрашен в синий цвет, при разбавлении возникает розовая окраска:



Величина оптической плотности многих окрашенных растворов в сильной степени зависит от pH, при котором производится измерение. На рис 1 показана зависимость светопоглощения от концентрации ионов водорода в растворе для окрашенного соединения, образовавшегося в результате реакции между 2,6-дихлорхинонхлоримидом и трет-бутил-4-метоксифенолом [60]. При оптимальном pH интенсивность окраски бывает наибольшая (в приведенном примере оптимальный pH 9,5). Для таких веществ измерение поглощения света проводится в буферном растворе, т. е. растворе, способном поддерживать в системе определенный pH.

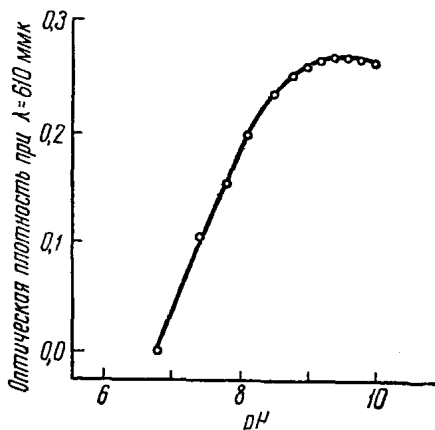


Рис 1. График зависимости оптической плотности от pH раствора [60]

Отклонения от закона Бера могут также зависеть от таких причин, как изменение поглощения света раствором в процессе хранения и т. д.

Примером раствора, подчиняющегося закону Бера в пределах воспроизводимости фотографического метода регистрации ($\pm 2 - 3\%$), является раствор азобензола в бензоле (табл. 1) [1].

Таблица 1

Длина волны в мик	Молярный коэффициент погашения при концентрации раствора		
	0 0001 М	0,001 М	0,002 М
546	17	16	15
486	320	310	305
436	650	665	645
404	350	343	—

Примером раствора, не подчиняющегося закону Бера, является раствор ацетона в гексане (табл. 2) [1].

Таблица 2

Длина волны в мик	Молярный коэффициент погашения при концентрации раствора	
	0,146 М	1,82 М
308,5	4,71	3,12
306,5	5,38	3,63
304,5	6,25	4,39
261,5	10,78	8,33
257,0	8,34	6,51
248,0	5,38	3,63

Как видно из данных табл. 2, молярный коэффициент погашения значительно меняется в зависимости от концентрации ацетона и, следовательно, закон Бера в этом случае неприменим.

Для выявления применимости закона Бера в практике химических исследований часто пользуются не определением и вычислением молярных коэффициентов погашения и их сравнением, а графическим изображением зависимости поглощения от концентрации.

При графическом изображении зависимости оптической плотности (экстинкции, погашения) от концентрации вещества в растворе в большинстве случаев близ начала координат получают прямую линию. При большем или меньшем удалении от начала координат прямолинейная зависимость оптической плотности от концентрации нарушается (рис. 2).

Как видно из рис. 2 [3], только в пределах низкой концентрации для данного вещества наблюдается прямолинейная зависимость между оптической плотностью и его концентрацией; в этих пределах концентрации раствор подчиняется закону Бера. Поскольку в практике отклонение от закона Бера встречается часто, то в каждом отдельном случае, если нет рекомендаций в методике, следует выяснить, при каких концентрациях соблюдается вышеуказанный закон.

В пределах концентраций, при которых наблюдается подчинение закону Бера, количество вещества можно подсчитать стехиометрически

Отклонения от закона Бера могут быть вызваны и флуоресценцией растворенного вещества, плохой пропускаемостью растворителя. Например, измерение максимума поглощения фенола при 210—220 мкм (в зависимости от растворителя) затрудняется тем, что чистый растворитель сам интенсивно поглощает свет в этой области спектра; при таких невыгодных условиях рассеянное излучение составляет существенную часть всего излучения, достигающего фотоэлемента. В этом случае наблюдаемое отклонение от закона Бера может зависеть от обеих указанных причин

В некоторых случаях образование окрашенного соединения и интенсивность окраски раствора за счет этого соединения зависят от ряда таких, казалось бы, незначительных факторов, как количество прибавляемого реактива, порядок его добавления, концентрация реактива.

Терминология, применяемая в абсорбционной спектрофотометрии, очень разнообразна [1, 80]. В табл. 3 приведены термины, применяемые наиболее часто.

Если применяют спектры поглощения для качественного анализа, исследуемый раствор измеряют в определенной области спектра через 1—2 мкм на протяжении всего нужного участка спектра и затем графически изображают полученные результаты, откладывая по оси абсцисс длины волн в миллимикронах, по оси ординат — пропускание в процентах или оптическую плотность.

На рис. 3 показаны спектрофотометрические кривые оксигемоглобина, это вещество имеет две полосы поглощения с максимумами при длинах волн 542 мкм и 582 мкм (см рис. 3). Под максимумом поглощения понимают длину волны, при которой на кривой поглощения появляется пик.

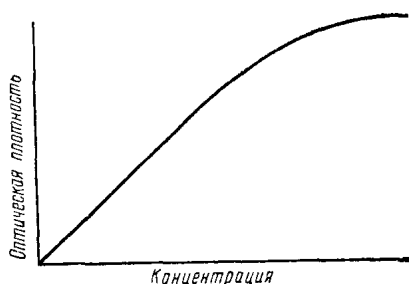


Рис 2 График зависимости оптической плотности от концентрации [3]

Таблица 3[1]

Термин	Символ	Определение	Связь с другими величинами
Оптическая плотность, или погашение, или экстинкция	D или E	$D = \lg \frac{I_0^*}{I}$	$D = E = Kl = \epsilon cl^*$
Коэффициент погашения	K	$I = I_0 \cdot 10^{-Kl}$	$K = \frac{E}{l}$
Коэффициент поглощения	σ или κ	$I = I_0 e^{-\alpha l}$	$\alpha = \kappa = 2,303 K$
Молярный коэффициент погашения	ϵ	$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon cl}$	$\epsilon = \frac{E}{cl} = E_{1 \text{ см}}^{\text{моль}}$
Удельный коэффициент погашения	$K_{уд}$	$K_{уд} = \frac{K}{c'}$	$K_{уд} = \frac{D}{c' \cdot d}^{***}$
Пропускание	T	$\lg \frac{1}{T} = E$	$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon cl}$
E -величина **	$E_{1 \text{ см}}^{1\%}$	D для толщины 1 см слоя 1%-ного раствора	—

* I_0 — интенсивность попадающего в вещество света;

I — интенсивность света, прошедшего через слой вещества толщиной l ;

l — толщина слоя в см;

c — концентрация в граммолях на литр;

** Название этой важной величины предложили Гиллем, Штерн.

*** Обозначение $\frac{D}{c' \cdot d} = K_{уд}$ часто встречается в иностранной литературе:

D — оптическая плотность;

c' — концентрация в г/л;

d — толщина слоя в см.

Обычно пишут c , а не c' , указывая, что это концентрация в г/л.

Из рис. 3 видно, что исследованный объект обладает избирательным поглощением, интенсивность поглощения заметно меняется с длиной волны. Избирательное поглощение в видимой области спектра обуславливает окраску тел.

Поглощение света органическими веществами связано с присутствием в молекулах веществ определенных химических групп — хромофоров. Не все классы органических соединений имеют хромофорные группы, пригодные для аналитических целей. Например, насыщенные углеводороды (парафины, циклопарафины) не имеют хромофорных групп в изучаемом интерва-

ле длин волн 200—1000 мкм; они прозрачны в этой области спектра (поэтому их часто применяют в качестве растворителей для изучаемых веществ). Спектры становятся избирательными, с хорошо выраженными полосами поглощения, если в молекуле вещества имеются определенные группы атомов группа сопряженных двойных связей, ароматические кольца, карбонильная группа, тиокарбонильная группа, нитрогруппа и др

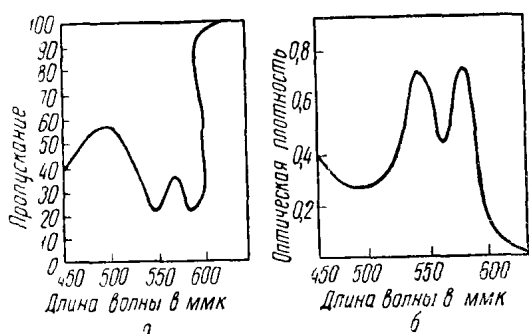


Рис 3 Кривые поглощения.
а—в процентах пропускания; б—в оптической плотности.

Природа поглощения света в видимой и ультрафиолетовой областях спектра зависит от изменения энергии электронов, участвующих в образовании химической связи [6]. Эти изменения не представляют собой непрерывного процесса, а совершаются скачками, происходит переход электронов с одного энергетического уровня на другой. Переход электронов сопровождается или поглощением лучистой энергии, или ее выделением. Частота излучаемого света зависит от разницы в энергетических уровнях электронного перехода: чем больше эта разница, чем больше необходимо затратить энергии на осуществление перехода, тем короче длина волны поглощаемого света. Различные химические связи характеризуются разной прочностью, с которой они удерживают электроны, определяющие эту связь, поэтому разные химические связи поглощают при разных длинах волн [6].

Для абсорбционного анализа в СССР широко применяют спектрофотометр типа СФ-4 и регистрирующий спектрофотометр типа СФ-10

Для абсорбционного анализа можно использовать универсальный монохроматор типа УМ-2 и другие монохроматоры. За рубежом преимущественно пользуются спектрофотометром Бекмана — модель DU, спектрофотометром Unicam и пр.

Универсальный монохроматор типа УМ-2 используют для измерения пропускания и отражения. Поскольку этот прибор может быть применен для решения различных задач спектрального анализа, то нами он описан позже в связи с его применением для измерения отражения.

Спектрофотометр СФ-4

Для спектрофотометрических исследований применяют полуавтоматический прибор спектрофотометр СФ-4. Этот прибор обладает достаточно высокой чувствительностью, точностью, прост, удобен и надежен в работе. Он построен по схеме спектрофотометра Бекмана. При помощи этого прибора можно измерять оптическую плотность и проценты пропускания растворов (жидкостей) и прозрачных твердых тел (например, стеклянных светофильтров). Спектрофотометр объединяет все необходимые для анализа элементы и дает возможность быстро и удобно получить нужные результаты в области спектра 220—1100 *мкм*. Спектрофотометр снабжен двумя источниками света: водородной лампой для измерений в области 220—350 *мкм* и лампой накаливания для измерений в области 320—1100 *мкм*. Третий источник света — ртутная лампа предназначена для проверки градуировки прибора.

Спектрофотометр снабжен двумя приемниками. Для измерений в области спектра 220—650 *мкм* используется сурьмяно-цезиевый фотоэлемент, для измерений в области спектра 600—1100 *мкм* — кислородно-цезиевый фотоэлемент. В аттестате каждого прибора указано, при какой длине волны на данном приборе следует переходить от измерений с сурьмяно-цезиевым фотоэлементом к измерениям с кислородно-цезиевым фотоэлементом.

Как указывалось выше, измерения, производимые на спектрофотометрах, в том числе СФ-4, обычно являются относительными. Измеряется пропускание или оптическая плотность исследуемого образца в отношении эталона. Пропускание последнего принимается за 100%, а оптическая плотность — за 0.

В химических и биохимических исследованиях эталоном обычно служит растворитель, в котором растворено исследуемое вещество или холостой (слепой, контрольный) раствор. Эталонную жидкость и исследуемый раствор помещают в одинаковые кюветы, все измерения делают по отношению к эталонной жидкости. На шкале длин волн устанавливают определенную длину волны, а на пути света, выходящего из монохроматора, поочередно ставят кювету с растворителем и кювету с измеряемым раствором. Отношение светового потока, прошедшего через измеряемый раствор, к световому потоку, прошедшему

через растворитель, читается по шкале отсчетного потенциометра.

Оптическая схема прибора приведена на рис. 4. Пучок лучей от источника света 1 (лампа накаливания, или водородная лампа, или ртутная лампа) падает на зеркальный конденсор 2.

Далее лучи, собранные зеркальным конденсором, направляются на плоское зеркало 3, а затем на входную щель 4, прикрытую кварцевой пластинкой 5.

Прошедший через щель параллельный пучок лучей отражается от зеркального объектива 6 и направляется далее на

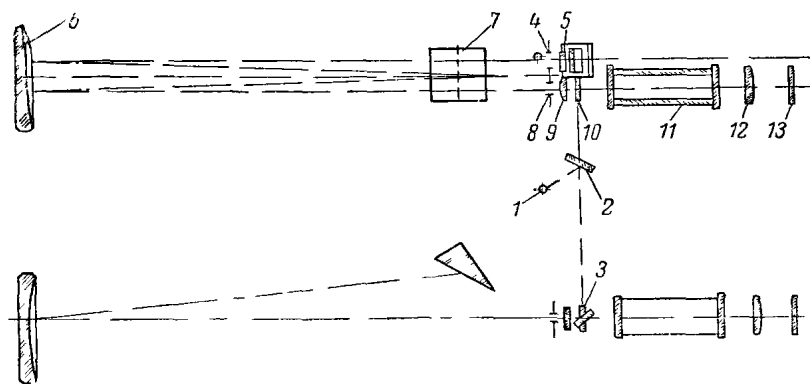


Рис 4 Оптическая схема спектрофогометра СФ 4

кварцевую призму 7, которая разлагает его в спектр и направляет обратно на объектив. Вращая призму 7, можно направить на щель любой участок спектра.

Пучок лучей фокусируется объективом на выходной щели 8, расположенной под входной щелью. Далее монохроматический пучок, пройдя щель 8, кварцевую линзу 9, светофильтр 10, кювету с исследуемым раствором 11 и защитную пластинку 12, попадает на светочувствительный слой фотоэлемента 13. Призма с преломляющим углом 30° , линза и защитная пластинка изготовлены из кристаллического кварца.

В нижней части блока на пути светового пучка, выходящего из монохроматора, установлен движок со светофильтрами, поглощающими рассеянный свет. В движке имеются три оправы, устанавливаемые против щели в трех фиксируемых положениях: в первом положении (движок не выдвинут) на пути светового пучка находится оправа, в которую можно установить любой, нужный для какой-либо работы фильтр, во втором положении—светофильтр УФС2 (при работе в области спектра 320—380 *мк*), в третьем—светофильтр ОС11 (при работе в области спектра 590—700 *мк*).

Под действием света в фотоэлементе возникает фототок, который вызывает на нагрузочном сопротивлении 2000 мгом падение напряжения.

Величина возникшего фототока пропорциональна световой мощности, падающей на фотоэлемент, поэтому падение напряжения также пропорционально световой мощности. Таким образом, измеряя напряжение на высокоомном сопротивлении, можно определить изменение светового потока.

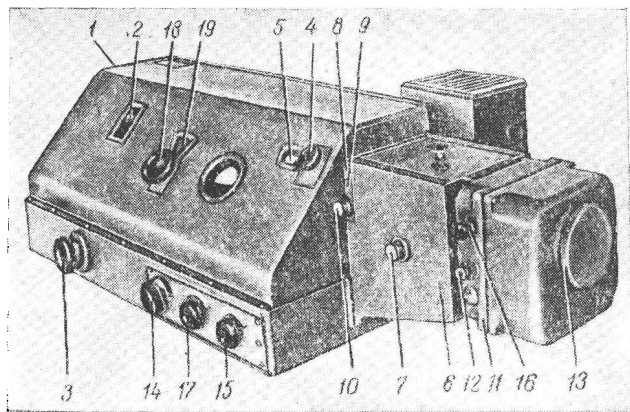


Рис. 5. Спектрофотометр СФ-4:

1—кожух; 2—шкала длин волн; 3—рукоятка поворота призмы; 4—рукоятка раскрытия щелей; 5—шкала отсчета величин раскрытия щели; 6—кюветное отделение; 7—рукоятка каретки; 8—блок; 9—регулируемый винт зеркала блока; 10—рукоятка движка с фильтрами; 11—камера с фотоэлементами; 12—рукоятка переключения фотоэлементов; 13—патрон осушки; 14—переключатель; 15—рукоятка потенциометра чувствительности; 16—шторка-переключатель; 17—рукоятка потенциометра темного тока; 18—рукоятка отсчетного потенциометра; 19—шкала отсчетов.

На приборе измеряется не абсолютная величина фототока, а только его изменение.

Когда на пути светового луча, выходящего из монохроматора, помещен эталон, на отсчетном потенциометре должно быть 100% пропускания, а стрелка миллиамперметра должна быть на нуле; в это положение она приводится изменением ширины щели и потенциометром чувствительности.

При установке измеряемого образца на пути светового луча количество света, попадающего на фотоэлемент, уменьшится и стрелка отклонится вправо; в нулевое положение она приводится отсчетным потенциометром, по которому и снимается отсчет (пропускание, плотность).

Основные элементы монохроматора (кварцевая призма, зеркальный объектив и щели) помещены внутри литого чугунного корпуса, закрытого кожухом 1 (рис. 5). Призма закрепле-