



*Филиал федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Астраханский государственный
технический университет» в Ташкентской области
Республики Узбекистан*

Факультет высшего образования

Кафедра ВБиТ

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВЫДЕЛЕНИЯ,
ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ И МОДИФИКАЦИИ ОСНОВНЫХ
КОМПОНЕНТОВ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И
ВОДНЫХ БИОРЕСУРСОВ**

**Методические указания по лабораторным работам для
магистров по направлению 19.04.03 «Продукты питания
животного происхождения»**

Ташкентская область, Кибрайский район – 2025

Составитель: Аверьянова Н.Д., к.т.н., доц. кафедры ВБиТ

Рецензент: Цибизова М.Е., д.т.н., проф. кафедры ВБиТ

Методические указания «Теоретические основы выделения, фракционирования и модификации основных компонентов сырья животного происхождения и водных биоресурсов» по лабораторным работам для магистров по направлению 19.04.03 «Продукты питания животного происхождения».

В методических указаниях по лабораторным работам приводятся научные основы выделения, фракционирования и модификации основных компонентов сырья животного происхождения и водных биоресурсов рекомендации по выбору объектов исследований и методам их выполнения.

Методические указания рассмотрены и одобрены кафедрой ВБиТ протокол № 7 от 21 февраля 2025 года.

Содержание	Стр.
Введение	4
Порядок допуска к лабораторным занятиям	4
Порядок проведения эксперимента	5
Требования к оформлению лабораторных работ	5
Правила техники безопасности	7
Первая помощь при возможных несчастных случаях в лаборатории	8
Лабораторная работа № 1. Изучение фракционного состава белковых веществ сырья животного происхождения и водных биоресурсов	9
Лабораторная работа № 2. «Изучение содержания жира в образцах мышечной ткани сырья животного происхождения и водных объектов (прудовой рыбы) и способов его выделения. Фракционный состав липидов»	20
Лабораторная работа № 3. Установление сравнительных уровней содержания углеводов в образцах покровной и костной тканях животных, птиц и водных объектов посредством установления их химических составов	38
Лабораторная работа № 4. Установление уровня содержания полисахарида – хитина в панцирьсодержащем сырье (ПСС) ракообразных, его органолептическая, физико-химическая характеристики	47
Лабораторная работа № 5. Установление уровня содержания полисахарида - зостерина в высушенной морской траве-зостере с разными сроками хранения при температуре окружающей среды, его органолептическая и физико-химическая характеристики	57
Список рекомендуемой литературы	80

Введение

К одной из отраслей производства продукции целевого назначения, в том числе и пищевого, относятся рыбная и мясная промышленности. В настоящее время специалисты указанных отраслей особое внимание уделяют разработке рациональных технологий изготовления продукции пищевого назначения из сырья животного происхождения и гидробионтов улучшенного качества. Повышению качества продукции способствует внедрение в технологический процесс дополнительных или новых операций, направленных на обогащение белков, улучшение их органолептических и физико-химических показателей, биологической ценности.

Рыбные белки не только не уступают по пищевой и биологической ценности белкам наземных животных, но и превосходят их по степени усвояемости. В рыбных белках, как и в белках животного происхождения присутствуют все незаменимые аминокислоты. Вместе с тем, в мясе присутствуют химические соединения, влияющие на его органолептические показатели (цвет, запах, вкус) и, соответственно, на качество. К ним относятся небелковый азот (НБА), азот летучих оснований (АЛО), летучие жирные кислоты (ЛЖК). Цель обогащения мяса заключается в снижении их количества, что позволяет получить продукцию пищевого назначения с более высокими показателями качества.

Мясо рыбы и млекопитающих содержат жирорастворимые витамины, все необходимые для организма человека макро- микроэлементы. В состав липидов гидробионтов и некоторых теплокровных входят биологически активные полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК).

С целью создания продуктов высокого качества, а также побочных продуктов из вторичного сырья, необходимо руководствоваться не только физико-химическими показателями сырья, но и фракционным составом белков, липидов и углеводов.

Курс дисциплины «Теоретические основы выделения, фракционирования и модификации основных компонентов сырья животного происхождения и водных биоресурсов» включает в себя методы фракционирования сырья, выделения основных компонентов (белковые вещества, жиры, углеводы и их производные), с изучением показателей качества и фракционных составов полученного вторичного сырья, п/ф, с целью установления направления дальнейшего использования.

Порядок допуска к лабораторным занятиям

К лабораторным занятиям допускаются студенты, подготовленные по соответствующим теоретическим материалам в соответствии с методическими указаниями настоящего сборника.

При подготовке к занятиям необходимо:

- изучить теоретические вопросы по теме предстоящих занятий по литературным источникам, приведённым в сборнике и по прочитанным лекциям;
- изучить методику выполнения лабораторных занятий, сущность основных методов определения химических показателей;
- ознакомиться с основными методами и способами переработки сырья в пищевые продукты;
- освоить методы выполнения необходимых расчетов, относящихся к обработке полученных результатов;
- составить план выполнения работы, с выделением основных этапов постановки эксперимента.

Степень подготовки студентов к выполнению очередных лабораторных занятий контролируется преподавателем в форме краткого собеседования. В случае недостаточной подготовленности студент не может быть допущен к занятиям. При этом студент не уходит из лаборатории, а использует время занятий, предназначенное для выполнения очередной темы, на теоретическую подготовку к не допущенной работе.

Порядок постановки эксперимента

Лабораторные занятия студенты выполняют в виде учебно–исследовательской работы (УИРС) группой по 2 человека.

Перед началом постановки эксперимента студент одевает халат и подготавливает рабочее место, отведённое в лаборатории, проверяет наличие необходимого оборудования, аппаратуры и химической посуды с реактивами, а также знакомится с устройством приборов и порядком измерений.

После каждого этапа лабораторной работы, предусмотренного в методических указаниях, полученные данные студент фиксирует в журнале исследований по рекомендованной форме. Результаты анализирует и обсуждает с преподавателем.

Лабораторное занятие считается выполненным при предъявлении студентом преподавателю полученных результатов и приведении рабочего места в надлежащий порядок.

Требования к оформлению лабораторных занятий

Лабораторная работа оформляется в форме отчёта, состоящего из:

- номера и наименования темы лабораторной работы;
- цели и задач проведения работы;
- объекта исследований;
- методов исследования;
- методики постановки эксперимента; - результатов исследований - выводов.

Перед началом лабораторного занятия преподавателем излагаются общие понятия, цель и задачи и краткие теоретические сведения по изучаемой теме, распределяются объекты исследования по группам студентов. В ходе

проведения лабораторных занятий преподаватель проверяет правильность постановки эксперимента, отвечает на возникшие вопросы и оказывает помощь в обсуждении полученных результатов и формированием выводов.

В пункте «объект исследования» приводится наименование образца, взятого для исследования.

В пункте «методика постановки эксперимента» последовательно описывается порядок проведения всех научных исследований по разработке технологии изготовления белковой продукции из сырья животного происхождения с указанием основных этапов, выбранного способа обработки сырья, параметров проведения экспериментов.

В пункте «методы исследования» приводится описание основных методов исследования, которые были использованы в работе. Описание методов исследований, которые осуществляются в соответствии с требованиями стандартов (ГОСТ), приводится в краткой форме.

В пункте «результаты исследований» приводятся полученные результаты, которые оформляются в табличной и графической форме, сопровождаемые выводами. Выводы должны содержать критический анализ качества сырья, влияния выбранных технологических параметров основных процессов на изменения его свойств, которые протекают при переработке, а также качества готовой продукции и её энергетической ценности. При этом следует полученные результаты сравнивать с действующими нормами отходов и потерь при переработке сырья животного и водного происхождения, требованиями соответствующей технической документации на сырьё и готовую пищевую продукцию, проводить анализ возможных расхождений между стандартными данными и полученными опытным путём.

На основании полученных результатов выполняются необходимые расчеты. Применяемые формулы расшифровываются с указанием характеристик используемых коэффициентов и показателей. Приводится разработанная модель технологической схемы изготовления опытного образца пищевой продукции.

В пункте «выводы» приводятся выводы по всей работе. Выводы должны содержать конкретно сформулированные основные результаты, полученные в ходе проведения работы. При написании выводов используют следующие формулировки: установлено, определено, выявлено, исследовано, изучено и т.д.

Определение органолептических и физико-химических показателей проводят с использованием стандартных методов исследований, приведенных в соответствующей технической документации или по методикам, разработанным и применяемым в исследованиях. Перед определением качества студенту необходимо ознакомиться с соответствующей ТД для выяснения перечня показателей, приведенных в данном стандарте. Определяемые показатели качества вносят в таблицу, установленные значения которых сравнивают с требованиями соответствующего стандарта и на основании сравнения делают заключение о качестве исследуемого образца.

При проведении анализов образца с применением химических соединений студенту необходимо использовать реактивы со степенью чистоты и отвечающие требованиям соответствующих стандартов, указанных в каждой лабораторной работе. В зависимости от степени чистоты и области применения химические вещества маркируют согласно требованиям стандартов и технических условий в следующем порядке (по повышению чистоты реактива):

- чистый (ч.);
- чистый для анализа (ч.д.а.); - химически чистый (х.ч.); - особой чистоты (ос.ч.).

Отчет по лабораторной работе оформляется на листах формата А4 в печатном варианте. При этом необходимо применять шрифт Times New Roman 14 пт, в таблицах — шрифт 12 пт, интервал одинарный, абзацный отступ 1 см.

Правила техники безопасности работы студентов в лаборатории

При прохождении лабораторного практикума студенты работают с различными реактивами, используют разнообразные электроприборы, поэтому от них требуется особая внимательность, аккуратность и осторожность в работе.

Перед началом лабораторных работ студенты проходят инструктаж по технике безопасности, после чего расписываются в соответствующем журнале. Кроме того, по ходу лабораторной работы они получают устный инструктаж от преподавателя, ведущего занятие.

С целью обеспечения безопасной работы в лаборатории необходимо соблюдать следующие условия:

- работать в спецодежде (бязевых или хлопчатобумажных халатах);
- избегать попадания химических реактивов на обнаженные участки тела, не трогать лицо и глаза руками, не принимать пищу, после окончания работы тщательно мыть руки;
- не пробовать химические реактивы на вкус;
- не допускается набирать в пипетку ртом кислоты, щелочи или растворы вредных веществ, с этой целью используют грушу;
- определять запах веществ крайне осторожно, не наклоняясь над сосудом и не вдыхая полной грудью, а направляя к себе пары или газы движением руки;
- работать с едкими, ядовитыми и легколетучими веществами в вытяжном шкафу, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией;
- не наклоняться над сосудом, в котором происходит кипение или куда наливают жидкость во избежание попадания брызг на лицо или в глаза;
- запрещается нагревать низкокипящие жидкости на открытом огне и электронагревательных приборах вне вытяжного шкафа с работающей вентиляцией;

- не допускается сливать в систему канализации концентрированные растворы кислот и щелочей, а также растворы солей тяжелых металлов, легковоспламеняющиеся жидкости (эфир, органические растворители и т.п.);
- запрещается пользоваться поврежденной лабораторной посудой, перед использованием в работе стеклянной посуды необходимо удостовериться в ее целостности, отсутствии трещин;
- не допускается нагревать или охлаждать воду или растворы в герметически закрытых сосудах;
- перед работой с повышенной температурой необходимо убедиться в наличии на лабораторной посуде соответствующего разрешающего знака;
- не допускается смешивать различные химические реактивы и их растворы между собой, если данные смеси не предусмотрены при проведении занятия.
- по окончании работы необходимо выключить электроприборы, закрыть воду и убрать рабочее место.

Первая помощь при возможных несчастных случаях в лаборатории

1. В случае пореза рану следует обработать 5 %-ным спиртовым раствором йода или 3 %-ным раствором перекиси.
2. При термических ожогах промыть пораженный участок раствором перманганата калия или этиловым спиртом.
3. При попадании на кожу концентрированной кислоты промыть пораженный участок водой, а затем обработать слабым раствором бикарбоната натрия (содой) или аммиака.
4. При попадании на кожу щелочи промыть пораженный участок водой, а затем обработать слабым раствором уксусной кислоты.

Лабораторная работа № 1. Изучение фракционного состава белковых веществ сырья животного происхождения и водных биоресурсов

Цель работы: изучить фракционный состав белковых веществ сырья животного происхождения и водных объектов

Задачи:

1. Изучить органолептические показатели качества сырья животного происхождения и водных объектов в соответствии с требованиями ГОСТ и требования СанПиН 2.3.2.1078 на исследуемый объект.
2. Осуществить при необходимости отделение соединительной, жировой ткани и т.д. от мышечной и провести её измельчение.
3. Изучить химический состав, характеристику азотистых веществ мышечной ткани животного сырья и водных биоресурсов.
4. Определить количественное соотношение фракций азотистых веществ в исследуемом объекте;
5. Рассчитать количественное соотношение фракций белка: альбуминов, глобулинов, и миостроминов
6. Оформить полученные данные в табличной форме, проанализировать и сформулировать выводы.

Объекты исследования: образцы животного мяса, рыбы, птицы, фарша, модифицированный фарш.

Методы исследования.

Отбор проб мясного сырья проводить по ГОСТ Р 51447-99 «Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб», ГОСТ 7269 «Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести», водных биоресурсов в соответствии с ГОСТ 31339-2006 «Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб». Определение органолептических показателей - ГОСТ 9959-91 «Продукты мясные. Общие условия проведения органолептической оценки» и ГОСТ 7631-2008. Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Методы определения органолептических и физических показателей. Определение содержания, %: воды, белка, минеральных веществ, липидов водоудерживающей способности (ВУС) мышечных тканей проводят по ГОСТ 7636 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа». Определение содержания в мышечной ткани сердец наземных животных: воды – по ГОСТ Р 51479-99 «Мясо и мясные

продукты. Метод определения массовой доли влаги», жира - по ГОСТ 23042 «Мясо и мясные продукты. Методы определения жира», белка – по ГОСТ 25011-81 «Мясо и мясные продукты. Методы определения белка», золы – по ГОСТ 31727-2012 «Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли общей золы».

При определении содержания НБА, АЛО применяют методику Лазаревского.

Порядок выполнения работы.

1. Необходимое оборудование, инструменты и реактивы:

- доска разделочная;
- нож разделочный;
- линейка;
- мясорубка бытовая по ГОСТ 4025-78;
- ножницы;
- фильтровальная бумага по ГОСТ 12026-76;
- гири массой 1 кг;
- бумага калечная (калька);
- пластины из плестиглаза или стеклопластика;
- часы;
- шкаф сушильный по ГОСТ 13474-79;
- весы аналитические класса 4 с пределом измерения от 0 до 100 г по ТУ 25-06-1131-75;
- весы технические лабораторные класса 1 с пределом измерения от 0 до 1000 г;
- установка для минерализации органических веществ;
- аппарат для отгонки паров аммиака;
- аппарат экстракционный (аппарат Сокслета);
- перекись водорода (х. ч.) по ТУ 6-09-4211-85;
- смешанный индикатор (Таширо);
- H_2SO_4 ч. или х. ч. по ГОСТ 4204-77, 0.02 н раствор;
- H_2SO_4 ч. или х. ч. по ГОСТ 4204-77, 20 г/дм³ раствор;
- H_2SO_4 ч. или х. ч. по ГОСТ 4204-77, конц.;
- NaOH ч. д. а. по ГОСТ 4328-77, прокипяченный 33 %-ный раствор;
- KOH ч. д. а. по ГОСТ 24363-80, 0.02 н раствор;
- KOH ч. д. а. по ГОСТ 24363-80, 0.1 н раствор;
- MgO ч. по ГОСТ 4526-75, 5 %-ный раствор (магнезиальное молоко)

- нейтральный красный (нейтральрот) х. ч. по ТУ 6-09-1704-89 и метиловый синий х. ч. по ТУ 6-09-07-1341-87 (индикатор № 1);
- тимоловый синий ч. д. а. по ТУ 6-09-5437-90 и фенолфталеин ч. д. а. по ГОСТ 5850-72 (индикатор № 2);
- альбумин фармацевтический или пищевой;
- биуретовый реактив;
- формалин х. ч. или ч., 40 %-ный раствор;
- трихлоруксусная кислота х. ч., 5 %-ный раствор;
- растворитель (диэтиловый эфир х. ч. по ГОСТ 22300-76, петролейный эфир х. ч. по ГОСТ 11992-66 или 1,2-дихлорэтан х. ч. по ТУ 2631-08544493179-02);
- спирт этиловый пищевой по ГОСТ Р 51652-2000;
- вода дистиллированная безаммиачная, приготовленная по ГОСТ 4517-75;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

2. Определение химических показателей объекта исследования

2.1. Определение массовой доли воды в образце стандартным (арбитражным) методом по ГОСТ 7636-85

В предварительно высушенную до постоянной массы и взвешенную с точностью до 0,001 г бюксу (m_1) с песком и стеклянной палочкой отбирают 1,5÷2 г измельченного мяса (в случае определения массовой доли жира в высушенной пробе отбирают 5 г), навеску при помощи стеклянной палочки равномерно тонким слоем распределяют по дну бюксы, затем бюксу взвешивают (m_2). Бюксу с пробой помещают в сушильный шкаф и высушивают при температуре 100÷105 °С до постоянной массы. Первое взвешивание проводят через 3 часа после начала сушки, последующие — через 30÷40 минут.

Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя взвешиваниями не превышает 0,001 г.

Перед каждым взвешиванием бюксу с пробой помещают в эксикатор и охлаждают в течение 30 минут.

Бюксу с высушенной пробой охлаждают в эксикаторе и затем взвешивают (m_3). Массовую долю воды вычисляют по формуле 1 (в %):

$$X_B = \frac{(m_2 - m_3) \cdot 100}{(m_2 - m_1)} \quad (1)$$

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,5 %.

Вычисление проводят до первого десятичного знака.

2.2. Определение содержания общего азота методом Кьельдаля по ГОСТ 7636-85 на установке «Varoquest-3»

Навеску исследуемой пробы массой 0,3÷0,4 г, взвешенной с точностью до 0.0005, помещенную в закрытую с одной стороны трубочку из фильтровальной бумаги, переносят в колбу для минерализации, приливают 10 мл концентрированной серной кислоты и добавляют таблетку катализатора на основе сернокислой меди или 1 мл пергидроля. Колбу помещают в гнездо установки по минерализации «Varoquest-30».

ВНИМАНИЕ: установку включают только после заполнения всех 6 гнезд колбами с пробами.

Процесс минерализации заканчивают, когда в колбе образуется прозрачная жидкость голубого цвета или бесцветная (в случае использования в качестве катализатора перекиси водорода). Колбы с минерализатом выдерживают в гнездах до полного охлаждения, затем минерализат через стеклянную воронку осторожно переносят в мерную колбу объемом 100 мл. Колбу омывают 25÷30 мл дистиллированной воды, которую затем также переливают в мерную колбу. Мерную колбу доливают водой до метки и выдерживают 3÷4 часа для равномерного распределения минеральных веществ по всему ее объему.

Из мерной колбы в отгонную колбу пипеткой переносят 20÷25 мл рабочего раствора и устанавливают в аппарат для отгонки. Предварительно в аппарат устанавливают колбу-приемник объемом 250 мл, куда заранее вносят 30 мл 0,02 н раствора серной кислоты и 5 капель смешанного индикатора. В колбу-приемник опускают конец трубки холодильника аппарата и осуществляют отгонку паров аммиака по установленной в аппарате программе.

По окончании отгонки конец трубки холодильника обмывают дистиллированной водой в колбу-приемник и содержащийся в ней избыток серной кислоты оттитровывают 0,02 н раствором КОН до перехода синей окраски до сине-зеленой (цвет морской волны).

Массовую долю общего азота вычисляют по формуле 2 (в %):

$$X_{\text{oa}} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot K \cdot 0,00028 \cdot V_3 \cdot 100}{m \cdot V_4} \quad (2)$$

Где: V_1 - количество 0,02 н раствора NaOH, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл;

V_2 - количество 0,02 н раствора NaOH, израсходованного на титрование в рабочем опыте, мл;

V_3 - объем мерной колбы с рабочим раствором, мл;

V_4 - объем рабочего раствора, взятого на отгонку, мл;

0,00028- количество азота, эквивалентное 1 мл 0,02 н раствора KOH, г/мл; m - масса навески, гр;

K - поправочный коэффициент для 0,02 н раствора KOH.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,5 % для кормовой муки и 0,2 % для остальной продукции.

Вычисление проводят до второго десятичного знака.

2.3. Определение содержания формальнотитруемого азота (ФТА) методом титрования по ГОСТ 7636-85

Приготавливают 10 %-ную вытяжку: 10÷25 г фарша, взвешенного с точностью до 0,01 г, растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством воды, переносят в мерную колбу объемом 100÷250 мл, колбу заливают дистиллированной водой до 2/3 объема. Содержимое колбы быстро прогревают до кипения на сильном огне. После прогрева колбу взбалтывают на перемешивающем устройстве с частотой колебаний 40÷60 кол/мин в течение 20 минут, охлаждают до 20 °С, доводят до метки водой, вытяжку фильтруют через складчатый фильтр в коническую колбу объемом 100 мл.

Для определения ФТА необходимо три колбы на 100 мл. В колбу № 1 пипеткой вносят 20÷25 мл фильтрата, 0,8÷1 мл индикатора № 2, 10 мл 40 %-ного раствора формалина, затем титруют 0,1 н раствором KOH до перехода окраски от желтой до сине-розовой. В колбу № 2 пипеткой вносят 20÷25 мл фильтрата, 0,8÷1 мл индикатора № 2, 0,4÷0,5 мл индикатора № 1, затем титруют 0,1 н раствором KOH до перехода окраски от синей до цвета морской волны (зеленоватого оттенка). В колбу № 3 пипеткой вносят 20÷25 мл воды, 0,8÷1 мл индикатора № 2, 10 мл 40 %-ного раствора формалина, затем титруют 0,1 н раствором KOH до перехода окраски от желтой до синерозовой.

Расчет количества ФТА проводят по формуле 3 (мг/100 г):

$$X_{\text{фта}} = \frac{(V_1 - V_2 - V_3) \cdot K \cdot 1,4 \cdot V_4 \cdot 100}{m \cdot V_5} \quad (3)$$

Где: V_1 - количество 0,1 н раствора КОН, израсходованного на титрование колбы № 1, мл;

V_2 - количество 0,1 н раствора КОН, израсходованного на титрование колбы № 2, мл;

V_3 - количество 0,1 н раствора КОН, израсходованного на титрование колбы № 3, мл;

V_4 - объем мерной колбы, мл;

V_5 -объем фильтрата, взятого на отгонку, мл; m - масса навески, гр;

1,4 - количество азота, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора КОН;

K - поправочный коэффициент для 0,1 н раствора щелочи;

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,2 %.

Вычисление проводят до третьего десятичного знака.

2.4. Определение содержания небелкового азота (НБА)

Водную вытяжку готовят также, как для определения ФТА . В коническую колбу объемом 100 мл пипеткой вносят 10÷20 мл фильтрата, добавляют 10÷20 мл 5 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и через 15 минут фильтруют через складчатый фильтр в колбу объемом 100 мл.

В колбу для минерализации пипеткой вносят 10÷20 мл фильтрата, приливают 10 мл концентрированной серной кислоты и добавляют таблетку катализатор на основе сернокислор меди или 1 мл пергидроля. Колбу помещают в гнездо установки по минерализации. Далее проводят определение содержания НБА согласно описанию.

Содержание НБА вычисляют по формуле 4 (в %):

$$X_{\text{НБА}} = \frac{2 \cdot 100 \cdot (V_1 - V_2) \cdot K \cdot 0,00028 \cdot V_3 \cdot V_4}{m \cdot V_5 \cdot V_6} \quad (4)$$

Где: V_1 - количество 0,1 н раствора КОН, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл;

V_2 - количество 0,1 н раствора КОН, израсходованного на титрование в рабочем опыте, мл;

V_3 - объем мерной колбы, в которой готовилась вытяжка, мл; V_4 - общий объем минерализата (100), мл;

V_5 - объем фильтрата, взятого на минерализацию (10-20), мл;

V_6 - объем минерализата, взятого на отгонку (20-2)5, мл;

0,00028- количество азота, эквивалентное 1 мл 0,1 н раствора КОН, г/мл;

2- коэффициент, учитывающий разведение трихлоруксусной кислотой;

м- масса навески, гр;

К- поправочный коэффициент для 0,1 н раствора КОН.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,5 %.

Вычисление проводят до второго десятичного знака.

2.5. Определение содержания белкового азота

Белковый азот (БА) равен разности общего и небелкового азота и вычисляется по формуле 5 (в %):

$$X_B = (X_{oa} - X_{HBA}) * 6,25 \quad (5)$$

где: 6,25 - коэффициент пересчета общего азота на сырой протеин.

2.6 Определение массовой доли жира экстракционным методом в аппарате Сокслета по ГОСТ 7636-85

Измельченную пробу массой $2 \div 5$ г, отвешенную с точностью не более 0,001 г, высушивают при температуре $100 \div 105$ °С (см, работа № 1, п, 3,2) и количественно переносят в пакет из фильтровальной бумаги размерами 8x9 см. Стенки бюксы протирают кусочком ваты, смоченном в растворителе, вату присоединяют к навеске в пакет. Пакет с навеской закрывают сгибанием открытого конца и перевязывают ниткой. Снаружи пакет нумеруют графитовым (простым) карандашом, помещают в ту же бюксу и высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре $100 \div 105$ °С. Высушенный пакет с пробой помещают в экстрактор 1 аппарата Сокслета. В экстрактор можно поместить несколько пакетов при условии, что в процессе экстракции все пакеты будут погружены в растворитель и хорошо им омыты. В колбу со шлифом 2 объемом 500 мл заливают растворитель в количестве $1,2 \div 1,3$ от емкости экстрактора, но не более 300 мл, колбу с растворителем соединяют с нижней частью экстрактора.

Верхнюю часть экстрактора соединяют с холодильником 3 с водяным охлаждением. Конструкцию устанавливают на нагревательную поверхность, закрепляют на штативе, включают вентилем подачу холодной воды и нагревательное оборудование (электроплитку).

Экстракцию жира проводят в течение $10 \div 12$ часов. Интенсивность нагрева должна быть такой, чтобы в течение одного часа происходило не

менее 5÷6 и не более 8÷10 сливаний растворителя. Окончание экстракции проверяют нанесением капли стекающего из экстрактора растворителя на часовое стекло. После испарения растворителя на стекле не должно оставаться жирного пятна.

По окончании экстракции пакет помещают в ту же бюксу и в течение 20÷30 минут выдерживают в вытяжном шкафу для удаления растворителя. Затем высушивают в шкафу в течение 1÷3 часов при температуре 100÷105 °С, охлаждают в эксикаторе и взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,001 г.

Массовую долю жира вычисляют по формуле 6 (в %):

$$X_{\text{ж}} = \frac{(m_1 - m_2) * 100}{m} \quad (6)$$

где: m_1 - масса высушенных бюксы, пакета и образца до экстракции, г;
 m_2 - масса высушенных бюксы, пакета и образца после экстракции, г;
 m - масса исследуемого образца, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,5 .

Вычисление проводят до первого десятичного знака.

2.7 Определение содержания минеральных веществ

Метод определения содержания минеральных веществ основан на полном сжигании органических соединений, удалении продуктов их сгорания и установлении оставшейся минеральной составной части.

Навеску исследуемого образца массой 5-7 г взвешивают в предварительно прокаленном до постоянной массы и взвешенном фарфоровом тигле с точностью до 0,0001 г. Тигель с навеской устанавливают на электроплитку, обугливают до полного прекращения выделения дыма, затем помещают в муфельную печь и прокаливают при температуре 500-550 °С.

Прокаливание продолжают до тех пор, пока зола, окрашенная в белый, сероватый или желтоватый цвет, не будет иметь темных частиц несгоревшего угля.

Прокаленный тигель с золой охлаждают и взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,0001 г.

Массовую долю минеральных веществ вычисляют по формуле 7 (в %):

$$X_{\text{в}} = \frac{(m_2 - m_1) * 100}{(m - m_1)} \quad (7)$$

где: m_1 - масса пустого тигля, г;

m_2 - масса тигля с золой после прокаливания, г; m -
масса тигля с образцом до прокаливания, г;

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,5 %.

Вычисление проводят до первого десятичного знака.

2.7. Определение азота отдельных белковых фракций

В основу разделения отдельных фракций белков положена их различная способность растворяться в воде, растворах нейтральных солей средней концентрации и слабых растворах щелочей.

Подготовка проб к исследованию. С целью отделения белковых веществ объект исследования смешивают с различными растворителями (вода, раствор NaCl 7,5 %, раствор NaOH 0,05 %). В полученных вытяжках (водной, солевой и щелочной – соответственно) определяют содержание азота. Кроме того, исследуют остаток мяса после щелочного извлечения, а в отдельной навеске мяса рыбы определяют небелковый азот.

2-4 г тонко измельченное в ступке мясо рыбы отвешивают в колбу на 200-250 мл., заливают 75 мл растворителя (воды, раствора NaCl или щелочи) и при периодическом взбалтывании выдерживают на льду или в холодильнике при 3-4°C в течении суток. После настаивания вытяжку декантируют или фильтруют через вату в мерную колбу емкостью 250 мл. Фильтр с задержанной на нём плотной частью переносят снова в колбу для настаивания, заливают 50 мл растворителя и повторяют настаивание, как и в первый раз. Такую обработку проводят 4-5 раз, до полного извлечения белков растворителем.

Полученные после всех настаиваний вытяжки соединяют вместе, доводят водой до объема 250 мл и фильтруют через сухой бумажный фильтр. Затем отбирают в колбу для сжигания 20-100 мл фильтрата и определяют в нем азот по методу, описанному выше. В каждой вытяжке определяется сумма нескольких разновидностей азота, а именно: в водной – сумма азота небелкового и альбуминов; в солевой вытяжке – азот небелковый, альбуминов и глобулинов и, в щелочной- азот небелковый, альбуминов, глобулинов и миостроминов. Таким образом, вычитая из азота водной вытяжки (ААВ) небелковый азот (НБА), устанавливают уровень азота альбуминов; вычитая из азота солевой вытяжки (АСВ) азот водной вытяжки – уровень азота глобулинов; вычитая из азота щелочной вытяжки (АЩВ) азот солевой вытяжки – азот миостроминов.

Иногда определение отдельных белковых фракций осуществляют следующим образом.

45 г тонко измельченной пробы взбалтывают в течение 3-5 мин с 900 мл экстрагирующего раствора, содержащего от 6 до 7,5 % хлористого натрия с добавлением 0,02 М раствора NaHCO_3 до получения pH от 7 до 7,5. Предварительно солевой раствор охлаждают с таким расчетом, чтобы после смешивания мяса с раствором температура не поднималась выше 5 °С. После взбалтывания смесь центрифугируют 30 мин, со скоростью не менее 2000 об/мин. В раствор переходит небелковый азот, азот альбуминов и глобулинов. Для определения суммы всех названных форм азота 5 мл солевого раствора сжигают обычным методом.

Азот глобулинов (АГ) или миозинов в экстракте определяют следующим образом. Отбирают 5 мл солевого раствора белков и приливают 45 мл дистиллированной воды, охлажденной до температуры 0 °С. Происходит количественное выпадение глобулинов с осадок. После суточного отстаивания на холоде осадок глобулинов определяют получасовым центрифугированием со скоростью не менее 3000 об/мин. После удаления жидкости осадок глобулинов растворяют в нескольких миллилитрах 1N раствора NaOH, раствор количественно переносят в колбу для сжигания и определяют азот по методу Кьельдаля.

В отдельной навеске определяют содержание общего азота и небелкового азота, по вышепредставленным методикам.

После установления значений фракций белков, проводят расчет по формулам:

$$\text{азот альбуминов (АА)} = (\text{АВВ} - \text{НБА}) * 5,55 \quad (8)$$

$$\text{азот глобулинов (АГ)} = (\text{АСВ} - \text{АВВ}) * 5,55 \quad (9)$$

$$\text{азот миостроминов (АМ)} = (\text{АЦВ} - \text{АСВ}) * 5,55 \quad (10)$$

$$\text{азот нерастворимых веществ (АНВ)} = (\text{ОА} - \text{АЦВ}) \quad (11)$$

Результаты исследований оформляют в виде таблицы 6.

3. Анализ результатов исследований

Органолептические показатели качества мышечной ткани животного сырья и водных биоресурсов рекомендуется оформлять по форме табл. 1

Таблица 1

Органолептические показатели качества мышечной ткани животного сырья и водных биоресурсов

Наименование показателя	Характеристика показателя качества	
	по требованию стандарта	исследуемого образца
Внешний вид		
Цвет		
Запах		
Показатели *		

* Показатели качества в соответствии с требованиями действующего стандарта на выданный образец

Анализ изучения химического состава заданного объекта оформляется в виде сводной таблицы 2.

Таблица 2

Химический состав и энергетическая ценность исследуемых объектов

Объект исследования	Содержание, %				Энергетическая ценность, ккал
	воды (В)	белка (Б)	жира (Ж)	минеральных веществ (Мв)	

На основании полученных результатов осуществляется заключение, в котором анализируются полученные данные и указывается к какому виду рыб (низкобелковым, белковым, высокобелковым, маложирным, жирным, высокожирным) относится данный вид сырья.

Анализ изучения содержания азотистых веществ в исследуемых объектах оформляется в виде сводной таблицы 3.

Таблица 3

Содержание азотистых веществ в мышечной ткани животного сырья и водных биоресурсов

Исследуемый объект	Содержание, мг/100г				Содержание, %		
	ОА	НБА	АЛО	ФТА	НБА/ОА	ФТА/ОА	АЛО/ОА

Данные по фракционному составу белковых веществ в объектах исследования приводятся по форме табл. 4.

Таблица 4

Фракционный состав белковых веществ мышечной ткани животного сырья и водных биоресурсов

Объект исследования	Содержание, %			
	азот альбуминов (АА)	азот глобулинов (АГ)	азот миостроминов (АМ)	остаточный азот (АНВ)

На основании результатов исследований необходимо сделать выводы по фракционному составу белковых веществ сырья животного происхождения и водных биоресурсов.

4. Вопросы для самоконтроля

4.1. Элементарный состав белка, метод количественного его определения?

4.2. Методы выделения белка из биологического объекта?

4.3. Охарактеризуйте методы определения фракционного состава белковых веществ сырья животного и водного происхождения

4.4. Способы расщепления белков, их преимущества и недостатки?

4.5. Характеристика точного метода разделения пептидов, названного пептидными картами? 4.6. Белки, как сополимеры, определение их размеров и форм?

Лабораторная работа № 2

Изучение содержания жира в образцах мышечной ткани сырья животного происхождения и водных объектов (прудовой рыбы) и способов его выделения. Фракционный состав липидов

Цель работы: изучить содержание жира в образцах мышечной ткани сырья животного происхождения и водных объектов (прудовой рыбы), способов его выделения и фракционный состав извлеченных липидов из сырья животного происхождения и гидробионтов.

Задачи:

1. Установить уровень содержания липидов в исследуемом сырье;
2. Извлечь липиды из сырья животного происхождения различными способами (тепловой, карбамидно-тепловой, гидромеханический и т.д.);
3. Установить органолептические показатели полученного образца жира;
4. Изучить качественные показатели жира (кислотное, йодное, пероксидные числа и т.д.);
5. Установить категорию жира (медицинский, пищевой, ветеринарный, технический);
6. Изучить фракционный состав липидов

Объекты исследования: жиросодержащее сырье животного происхождения и гидробионтов, образец жира

Методы исследования:

Определение органолептических показателей качества сырья, проводятся в соответствии с требованиями ГОСТ 7631, ГОСТ 21784, ГОСТ 9959, ГОСТ 25011.

Органолептические показатели образцов жира и т.д. устанавливать сенсорным методом в соответствии с ГОСТ 7631.

Качественные показатели (физико-химические) выделенных образцов рыбных жиров: кислотное, йодное и пероксидное числа и т.д., были установлены стандартными методами, приведенным в ГОСТ 7636 [16].

Пересчет значений пероксидного числа на ммоль O_2 /кг осуществлять по ГОСТ 26593.

Порядок выполнения работы.

1. Необходимое оборудование, инструменты и реактивы:

- доска разделочная;
- нож разделочный;
- мясорубка бытовая по ГОСТ 4025-78;
- ножницы;
- шкаф сушильный по ГОСТ 13474-79;
- весы аналитические класса 4 с пределом измерения от 0 до 100 г по ту 25-06-1131-75;
- весы технические лабораторные класса 1 с пределом измерения от 0 до 1000 г;
- секундомер механический;
- баня водяная;
- колбы конические с притертой пробкой по ГОСТ 25336-82, вместимостью 250 см³;
- колба коническая с боковой отводной трубкой;
- цилиндр мерный по гост 1770-74, вместимостью 50 см³; – холодильник стеклянный лабораторный (обратный) по гост 25336-82;
- бюретки по гост 29251-91, вместимостью 25 и 50 см³;
- фенолфталеин (1%-ный);
- калия гидроксид по гост 24363-80, раствор 0,1 моль/дм³ (0,1 н) или натрия гидроксид по гост 4328-77, раствор 0,1 моль/дм³ (0,1 н);
- эфир медицинский по госфармакопее;
- спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962-67;
- тимолфталеин, спиртовой раствор 10 г/дм³ (1%-ный);
- кислота соляная по ГОСТ 3118-77, раствор 0,5 моль/дм³ (0,5 н); – спирт этиловый ректификованный по гост 5962-67;
- калия гидроксид по гост 24363-80, спиртовой раствор 0,5 моль/дм³ (0,5 н);

- крахмал растворимый по ГОСТ 10163-76, раствор 10 г/дм³ (1%ный), к которому прибавляют кристалл для стойкости при хранении;
- карбамид (синтетическая мочевиная);
- дистиллированная вода с разными показателями pH среды (кислая, нейтральная, щелочная);
- pH-метр;
- петролейный эфир по ГОСТ 11992;
- диэтиловый эфир по ГОСТ 22300;
- ледяная уксусная кислота по ГОСТ 61;
- пластина со слоем силикагель-гипс;
- 10 % фосфорномолибденовая кислота в 96%-ном этаноле;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

2. Определение содержания липидов

Определение массовой доли липидов

Большинство методов определения массовой доли липидов основано на экстракции жира органическим растворителем (или их смесью). Полученная мисцелла¹ может быть использована как для определения непосредственно массовой доли липидов, так и для исследования их качества. Определение концентрации мисцеллы, как правило, осуществляют путём упаривания её части (или всей мисцеллы), реже – рефрактометрическим методом.

Определение массовой доли липидов экстракцией бинарной смесью.

Метод основан на растворении липидов в продуктах бинарной смеси органических растворителей, отделении (отгонке) их и весовом определении массовой доли липидов. В продуктах с содержанием массовой доли воды более 20 % применяют метод Блайя-Дайера, при содержании жира 20 % и менее применяют метод Фолча.

Экстракционный метод Блайя – Дайера

Оборудование, материалы и реактивы: делительная воронка, колбы конические вместимостью 250 см³, 100 см³, мерные колбы вместимостью 100 см³, стеклянные воронки, фильтровальная бумага, этиловый спирт, хлороформ, 20%-ный раствор ацетата цинка, безводный сернокислый натрий.

Проведение испытания. Продукт тщательно измельчают и определяют его влажность. 5-10 г навески², отвешенных с погрешностью не более 0,001 г,

¹ Мисцелла – это раствор жира в органическом растворителе.

² При выборе массы навески следует учитывать жирность сырья

помещают в колбу с притертой пробкой и встряхивают со смесью этанол: хлороформ : вода (около 40 см³) в соотношении 2:1:0,8 (с учетом воды, находящейся в ткани). По истечении 10 мин добавляют хлороформ до соотношения названных компонентов 2:2:0,8. После непрерывного перемешивания в течение 5 мин вводят 20 см³ водного раствора ацетата цинка до соотношения компонентов 2:2:1,8 и перемешивают в течение 30 с (ацетат цинка обеспечивает лучшее разделение водно-спиртового и хлороформного слоев, особенно для термически обработанных продуктов).

Раствор отфильтровывают в делительную воронку через бумажный складчатый фильтр.

Плотную часть, оставшуюся на фильтре, промывают 4 – 5 раз в 20 см³ хлороформа, каждый раз отделяя жидкую часть в делительную воронку.

После полного разделения смеси (отсутствие мелких пузырьков в межфазовой пленке) нижний хлороформенный слой отделяют от водноспиртового слоя, сливая в разные емкости (хлороформный фильтрат сливают в мерную колбу и доводят до метки).

Часть хлороформного экстракта (25-50 см³) отбирают в предварительно высушенную и взвешенную до постоянной массы колбу со шлифом. Хлороформ удаляют испарением. Остаток с жиром высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 90—95°C, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Массовую долю липидов (X) в процентах вычисляют по формуле (1):

$$X = \frac{M \times 100 \times V}{M_1 \times V_1}, \quad (1)$$

где M – масса исследуемого образца, г; M₁ – масса жира в экстракте, взятом для анализа, г; V – общий объем экстракта, см³;

V₁ – объем экстракта, взятый для анализа (25-50 см³).

Допустимое расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,5%.

Оставшаяся часть мисцеллы может быть использована для определения качественных характеристик липидов.

Экстракция липидов методом Фолча

10 г тщательно измельченного продукта (с содержанием воды не более 20 %) экстрагируют 3 раза смесью хлороформ-этанол в соотношении 2:1 (50 см³). Первую экстракцию проводят при встряхивании на аппарате в течение 2 ч, две последующие - по 1 ч.

Раствор отфильтровывают в делительную воронку через бумажный фильтр. Остаток на фильтре промывают смесью хлороформ-этанол (4 раза по 10 см³). В делительную воронку добавляют воду (20% от объема экстракта, интенсивно встряхивают и оставляют на ночь до полного разделения хлороформного и водно-спиртового слоев.

Хлороформный фильтрат отделяют от водно-спиртового, переносят в мерную колбу и доводят до метки. Далее определение проводят аналогично методу Блайя-Дайера.

Определение массовой доли липидов методом капельной экстракции (ускоренный)

Метод основан на весовом определении жира после извлечения его растворителем из сухой навески.

Материалы оборудование и реактивы: стеклянная трубка диаметром 0,014 м и длиной 0,25 м; колба коническая, вместимостью 100 см³, весы технические, фарфоровая ступка с пестиком, серный эфир, безводный серноокислый натрий.

Проведение испытания. В трубку вкладывают плотный ватный тампон и два кружочка фильтровальной бумаги, диаметр которых несколько больше диаметра трубки, затем еще один ватный тампон. Общая толщина фильтрующей прокладки – 2 см. Налитый в трубку эфир, должен вытекать из нее со скоростью 40 – 100 капель в минуту.

5 – 7 г исследуемого продукта взвешивают с погрешностью не более 0,01 г и переносят в фарфоровую ступку, туда же добавляют двойное количество безводного сульфата натрия. Приготовленную смесь растирают, переносят в экстракционную трубку и уплотняют, осторожно постукивая последнюю нижним концом о ладонь. При анализе сухих продуктов (массовая доля воды до 20 %) растирание их с безводным сульфатом натрия не требуется. Трубку устанавливают в штатив над взвешенным сухим чистым стаканчиком. Чашки из-под навески и пестик трижды обрабатывают небольшими порциями эфира, сливая его в трубку. После того как эфир профильтруется, в трубку последовательно доливают еще 2 – 3 порции эфира по 5 – 10 мл. Экстракция считается законченной, если на фильтровальной бумаге не остается жирного пятна, в противном случае в трубку доливают еще одну порцию эфира. Каждая порция эфира проходит через трубку обычно за 15 – 20 мин, а процесс извлечения жира длится в среднем 1 – 2 часа.

После полного извлечения жира эфир из стаканчика выпаривают до удаления запаха и без предварительного высушивания взвешивают.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,5%.

Определение массовой доли липидов весовым методом с экстракцией в микроизмельчителе

Метод основан на извлечении жира растворителем из измельченной в микроизмельчителе навески. Реактивы: хлороформ (петролейный эфир), этиловый спирт.

Материалы, оборудование и реактивы: микроизмельчитель тканей РТ2, пипетка на 10 см³, стекло часовое, мерная колба, вместимостью 50 см³, электроплитка, эксикатор, безводный сернокислый натрий, хлороформ, серный эфир.

Проведение испытания. 5 г исследуемого продукта взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,01 г и переносят в фарфоровую ступку, туда же добавляют двойное количество безводного сульфата натрия. Приготовленную смесь растирают. При анализе сухих продуктов (массовая доля воды до 20 %) растирание их с безводным сульфатом натрия не требуется. В стакан микроизмельчителя переносят подготовленную навеску, добавляют 30 см³ смеси хлороформа и этилового спирта (1:2), затем помещают стакан в микроизмельчитель.

Измельчение продукта и экстракцию жира производят в течение 4 мин при 5000 об/мин. Затем смесь закрывают на 10 мин часовым стеклом и оставляют на 10 мин для осаждения взвешенных частиц.

Раствор жира фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 см³, остатки навески промывают 2-3 см³ растворителя, которые фильтруют в ту же колбу. Содержание колбы доводят растворителем до метки. Все работы проводят под вытяжным шкафом.

Из мерной колбы пипеткой отбирают по 10 см³ растворителя в две предварительно высушенные до постоянной массы и взвешенные бюксы, Растворитель выпаривают, а оставшийся жир подсушивают в сушильном шкафу при температуре $(102 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ до постоянной массы. Бюксы охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,5%.

Рефрактометрический метод определения массовой доли липидов

Метод основан на извлечении жира из навески изделия αбромнафталином. Массовую долю жира определяют по разности коэффициента преломления растворителя и раствора жира в растворителе.

При растворении жира коэффициент преломления растворителя понижается пропорционально количеству присутствующего жира. Чем больше разница между этими коэффициентами, тем точнее определение.

Оборудование, материалы и реактивы: рефрактометр РЛУ; ступка фарфоровая диаметром не более 7 см или фарфоровая чашка; стаканы стеклянные вместимостью 25-50 см³; воронки стеклянные диаметром не более 3 см; микропипетка вместимостью 2 см³ с делениями на 0,02 см³; пикнометр стеклянный вместимостью 25- 50 см³; бумага фильтровальная; вата обезжиренная гигроскопическая; беззольные фильтры, α -бромнафталин с коэффициентом преломления около 1,66 или α -хлорнафталин с коэффициентом преломления около 1,63.

Проведение испытания. В маленькую фарфоровую ступку с прокаленным песком (от 0,5 до 5 г) взвешивают навеску (таблица 1) с погрешностью не более 0,0002 г.

Таблица 1

Массовая доля жира в пробе

Массовая доля жира в пробе, %	Масса навески, г
Более 30	0,50
От 20 до 30	0,75
От 10 до 20	1,00
От 5 до 10	1,50
Менее 2г	От 2 до 5

Если в навеске более 5 % воды, то в ступку добавляют безводный сернокислый натрий (1:1), или пробу подсушивают 5 – 10 мин при температуре 110 °С. Пробы сдобных булочных и мучных кондитерских изделий исследуют без предварительного подсушивания.

Подсушенную навеску тщательно растирают, приливают растворитель (2 см³ на 1 г навески), который набирают калиброванной пипеткой с помощью маленькой груши. Навеску с растворителем тщательно растирают в течение 3 мин. Работу с растворителем проводят под тягой. Смесь из ступки переносят на маленький складчатый фильтр. Первые 2-3 капли фильтрата отбрасывают, а последующие 2-3 капли помещают на призму рефрактометра, которую предварительно протирают спиртом и снимают показания.

Определение коэффициента преломления проводят при температуре 20±0,2 °С или при любой комнатной температуре. В последнем случае показатель преломления раствора приводят к температуре 20 °С путем внесения поправок по таблице .

Отсчет показаний преломления можно производить без введения поправок на температуру при условии одновременного определения показателя преломления растворителя при той же температуре.

По показателю преломления раствора жира в α -монобромнафталине рассчитывают массовую долю жира J (%)

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,5%.

В табл. 2 и 3 приведены коэффициенты преломления и плотности некоторых жиров.

Таблица 2

Коэффициенты преломления и плотности жиров

Т, °С	Поправк	Т, °С	Поправк	Т, °С	Поправк	Т, °С	Поправк	Т, °С	Поправк
Отнять от показания преломления									
15,0	0,0022	15,0	0,0018	15,0	0,0013	15,0	0,0009	15,0	0,0004
,1	0,0022	,1	0,0017	,1	0,0013	,1	0,0008	,1	0,0004
,2	0,0021	,2	0,0017	,2	0,0012	,2	0,0008	,2	0,0004
,3	0,0021	,3	0,0016	,3	0,0012	,3	0,0007	,3	0,0003
,4	0,0020	,4	0,0016	,4	0,0011	,4	0,0007	,4	0,0003
,5	0,0020	,5	0,0016	,5	0,0011	,5	0,0007	,5	0,0002
,6	0,0019	,6	0,0015	,6	0,0011	,6	0,0006	,6	0,0002
,7	0,0019	,7	0,0015	,7	0,0010	,7	0,0006	,7	0,0001
,8	0,0018	,8	0,0014	,8	0,0010	,8	0,0005	,8	0,0001
,9	0,0018	,9	0,0014	,9	0,0009	,9	0,0005	,9	0,0000
Прибавить к показанию преломления									
20,0	0,0000	22,0	0,0009	24,0	0,0018	26,0	0,0026	28,0	0,0035
,1	0,0000	,1	0,0009	,1	0,0018	,1	0,0027	,1	0,0036
,2	0,0001	,2	0,0010	,2	0,0018	,2	0,0027	,2	0,0036
,3	0,0001	,3	0,0010	,3	0,0019	,3	0,0028	,3	0,0037
,4	0,0002	,4	0,0011	,4	0,0019	,4	0,0028	,4	0,0037
,5	0,0002	,5	0,0011	,5	0,0020	,5	0,0029	,5	0,0037
,6	0,0003	,6	0,0011	,6	0,0020	,6	0,0029	,6	0,0038
,7	0,0001	,7	0,0012	,7	0,0021	,7	0,0029	,7	0,0038
,8	0,0003	,8	0,0012	,8	0,0021	,8	0,0030	,8	0,0039
,9	0,0004	,9	0,0013	,9	0,0022	,9	0,0030	,9	0,0039

21,0	0,0004	23,0	0,0013	25,0	0,0022	27,0	0,0031	29,0	0,0040
,1	0,0004	,1	0,0014	,1	0,0022	,1	0,0031	,1	0,0040
,2	0,0005	,2	0,0014	,2	0,0023	,2	0,0032	,2	0,0040
,3	0,0006	,3	0,0015	,3	0,0023	,3	0,0032	,3	0,0041
,4	0,0006	,4	0,0015	,4	0,0024	,4	0,0033	,4	0,0041
,5	0,0007	,5	0,0015	,5	0,0024	,5	0,0033	,5	0,0042
,6	0,0007	,6	0,0016	,6	0,0025	,6	0,0033	,6	0,0042
,7	0,0007	,7	0,0016	,7	0,0025	,7	0,0034	,7	0,0043
,8	0,0008	,8	0,0017	,8	0,0026	,8	0,0034	,8	0,0043
,9	0,0008	,9	0,0017	,9	0,0026	,9	0,0035	,9	0,0044

Таблица 3

Коэффициенты преломления и плотности жиров

Жир	Коэффициент преломления при 20 °С	Плотность при 20 °С
Коровье масло	1,4605	0,920
Маргарин	1,4690	0,928
Подсолнечное масло	1,4736	0,924
Арахисовое масло	1,4696	0,914
Горчичное масло	1,4769	0,918
Комбижир	1,4709	0,925
Жир яйца	1,4591	0,925

Если неизвестно, какой жир или смесь жиров содержится в изделии, поступают следующим образом: 5 - 10 г измельченной пробы обезживают сернокислым натрием (2 - 4 г), смешивают с 15 - 25 см³ летучего жирорастворителя (например, диэтиловым эфиром, хлороформом), взбалтывают в течение 15 мин и фильтруют в колбочку. Растворитель полностью отгоняют, остаток подсушивают, после чего определяют коэффициент преломления выделенного жира. Плотность последнего принимают равной 0,925.

В полуфабрикатах из муки, сдобных булочных и мучных кондитерских изделиях массовую долю жира подсчитывают в процентах в пересчете на сухое вещество

2. Извлечение липидов из образцов мясного и рыбного видов сырья разными методами

Осуществляется выбор рационального способа выделения жира из жиросодержащего сырья. С этой целью апробируют разные способы извлечения жира: 1) тепловой с падающим температурным режимом 75°С; 2) карбамидно-тепловой; 3) комбинированный карбамидно-тепловой с понижением температуры; 4) гидромеханический.

Тепловой способ с падающим температурным режимом заключался в нарезании не до конца размороженных плавников сома на кусочки размерами частиц 2-3 см, с последующим измельчением на промышленном

волчке с диаметром частиц 2-3 мм, и тепловым нагревом (вытапливанием) при $t = 75\text{ }^{\circ}\text{C}$ продолжительностью 60 мин, отделении полуфабриката жира.

Карбамидно-тепловой способ получения жира осуществляется с различными концентрациями карбамида внесенного в сырье, с целью установления рациональной дозы внесения его, как гидротропного вещества. Извлечение жира осуществляется нарезанием сырья на кусочки размерами частиц 2-3 см, с последующим измельчением на промышленном волчке с диаметром частиц 2-3 мм, и тепловым нагревом (вытапливанием) при температуре $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ продолжительностью 60 мин при дозе карбамида 1,5, 3,0 и 5,0% к массе сырья в виде 30-% раствора, отделении полуфабриката жира с последующим центрифугированием подготовленной массы при частоте оборотов 3000 в минуту, продолжительностью 30 мин для отделения плотной части. После отстаивания жидкой фазы в течение 10 минут при температуре окружающей среды, отделялся посредством центрифугирования при 4000 об/мин продолжительностью 15 минут.

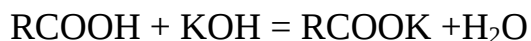
Комбинированный карбамидно-тепловой с понижением температуры способ заключается в нарезании сырья на кусочки размерами частиц 2-3 см, с последующим измельчением на волчке диаметром частиц 2-3 мм, с внесением различных доз карбамида (1,5, 3,0 и 5,0%) к массе сырья в виде 30%-го раствора и дальнейшем замораживанием. Через 1 сутки, подготовленная масса подвергается нагреву при температуре $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ с выдерживанием при этой температуре в течение 60 мин. Отделение полуфабриката жира осуществляется центрифугированием при частоте оборотов 3000 об/мин, продолжительностью 30 мин.

Гидромеханический способ получения жира заключается в нарезании сырья на кусочки размерами частиц 2-3 см, измельчением на промышленном волчке до диаметра частиц 2-3 мм, и добавлением 200 % воды к массе сырья с различными рН (11,61; 7,1; 2,95), с последующим нагревом массы до температуры $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ и выдерживании при этой температуре в центре массы в течение 60 мин, отделении полуфабриката жира и отстаивании жидкой части при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут, дальнейшим сбором полуфабриката жира после разделения фаз и центрифугированием плотной части и п/ф при частоте оборотов 3000 об/мин, продолжительностью 30 мин. Все полученные образцы рыбного жира исследуют по органолептическим (цвет, запах) и физико-химическим показателям качества (кислотное, пероксидное и йодное числа).

3. Установление качественных показателей жира, выделенного из жиросодержащего сырья различными способами

Определение кислотного числа жира

Количественное определение кислотного числа основано на нейтрализации свободных жирных кислот. Кислотное число условно выражают в мг щелочи, пошедшей на нейтрализацию свободных жирных кислот, содержащихся в 1 гр исследуемого жира.



Проведение испытания: в колбу отбирают такое количество мисцеллы, чтобы в ней содержалось не менее 1-2 гр жира.

Растворитель (хлороформ) удаляют под вакуумом, затем приливают 3050 см³ нейтрализованной по фенолфталеину смеси спирта с этиловым эфиром (1:2) и перемешивают взбалтыванием. Содержимое колбы титруют 0,1 н (0,1 моль/дм³) водным раствором едкого натрия по фенолфталеину. Кислотное число (X), выраженное в мг едкого калия вычисляют по формуле (2):

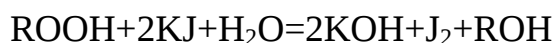
$$X = \frac{V \cdot K \cdot 5,61}{m} \quad (2)$$

где: V – количество 0,1 н (0,1 моль/дм³) раствора щелочи, израсходованное при титровании, см³; k - поправочный коэффициент титрованного раствора едкого калия 0,1 н (0,1 моль/дм³);

5,61 - количество едкого калия, соответствующее 1 см³ 0,1 моль/дм³ раствора едкой щелочи, мг; m - масса жира, гр.

Определение пероксидов в жире

Количественное определение перекисей в жире основано на реакции перекисей с йодистым калием в кислой среде, в результате которой выделяется свободный йод. Выделившийся йод титруют гипосульфитом натрия.



Перекисное число условно выражают количеством граммов йода, выделяемого перекисями из 100 гр жира.

Проведение испытания: в коническую колбу с притертой пробкой помещают 1 гр жира, навеску растворяют в 30 мл смеси (12 мл хлороформа и 18 мл ледяной уксусной кислоты), к р-ру приливают 1 мл насыщенного на холоде KI и перемешивают в течение 2-х минут.

Затем прибавляют в колбу 100 см³ свежeproкипяченной дистиллированной воды, охлажденной до комнатной температуры и 1 см³ 1%-ного (10 гр/дм³) раствора крахмала и немедленно титруют 0,01 н (0,01 моль/дм³) раствором тиосульфата натрия до исчезновения синего окрашивания.

Одновременно проводят контроль.

Переокисное число (П.Ч.) исследуемого жира вычисляют по формуле (3):

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot K \cdot B \cdot 100}{m} \quad (3)$$

где: V_1 - количество 0,01 н (0,01 моль/дм³) раствора тиосульфата, пошедшее на титрование йода в исследуемой пробе, см³;

V_2 - количество 0,01 н (0,01 моль/дм³) раствора тиосульфата, израсходованного на титрование при контрольном опыте, см³; k - поправочный коэффициент рабочего раствора 0,01 н (0,01 моль/дм³) тиосульфита; m - количество жира, гр ;

$$B = \frac{E \cdot N}{100} = \frac{126.9 \cdot 0.01}{1000} = 0,001269, \text{ гр.}$$

Применяемые реактивы должны быть химически чистыми. а величина V_2 при этих условиях не должна превышать 0,1 см³.

Определение йодного числа

Метод основан на взаимодействии йода с непредельными жирными кислотами. В колбу с притертой пробкой приливают 0,08-0,12 гр жира. В колбу доливают 3 мл петролейного эфира и 25 мл 0,2м солянокислого раствора хлористого йода. Колбу плотно закрывают, перемешивают и настаивают 5-10 мин. Затем вносят 10 мл KI 10%, 50 мл дист. воды и выделившийся йод титруют раствором 0,1 н тиосульфата натрия до светложелтого окрашивания. После в колбу приливают 1 мл р-ра крахмала, 2-3 мл хлороформа и продолжают титровать до исчезновения синего окраса. Параллельно проводят контрольный опыт.

Измеряется I_2 гр/100 гр жира или I_2 %, по формуле (4):

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot K \cdot 0,01269 \cdot 100}{m} \quad (4)$$

где:

V_1 - количество 0,01 н (0,01 моль/дм³) раствора тиосульфата, пошедшее на титрование йода в исследуемой пробе, см³;

V_2 - количество 0,01 н (0,01 моль/дм³) раствора тиосульфата, израсходованного на титрование при контрольном опыте, см³; k - поправочный коэффициент рабочего раствора 0,01 н (0,01 моль/дм³) тиосульфита; m - количество жира, гр.

Определение альдегидного числа

Метод основан на измерении интенсивности окраски соединений, образующихся при реакции альдегидов с бензидином.

Альдегидное число – это число миллиграммов коричневого альдегида, эквивалентного всем альдегидам, содержащимся в 1 грамме жира.

Оборудование, материалы, реактивы: фотоэлектроколориметр; пробирки вместимостью 2, 5 см³; колбы конические вместимостью 25 см³ с притертыми пробками; пипетки, вместимостью 10 см³; мерные колбы вместимостью 10 см³; 96 %-ный раствор этилового спирта, хлороформ; 0,5%-ный раствора бензидина свежеприготовленного; ледяная уксусная кислота.

Проведение испытания. В две сухие чистые мерные колбы с притертой пробкой вместимостью 25 см³ взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,002 г по 0,5 – 1,2 г исследуемого жира и доводят объем до метки смесью 96 %-ого этилового спирта с хлороформом (1:1). Полученный спирто-хлороформенный раствор жира (мисцеллу) хорошо перемешивают, и часть его помещают в кювету фотоэлектроколориметра или спектрофотометра с рабочей длиной 10 мм, и определяют оптическую плотность раствора при длине волны 350 нм (для спектрофотометра) или 360 нм (для фотоэлектроколориметра) по отношению к чистому растворителю, т. е. к смеси равных объемов хлороформа и этилового спирта.

Полученное значение оптической плотности (D_1) характеризует собственную окраску жира.

Затем в две колбы вместимостью 25 см³ с притертыми пробками вносят при помощи пипетки по 10 см³ приготовленного спирто-хлороформенного раствора жира (мисцеллы), а в третью — 10 см³ чистого растворителя (смесь равных объемов хлороформа и этилового спирта). В каждую колбу добавляют по 1 см³ 0,5%-ного свежеприготовленного раствора бензидина в смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 1:1.

Колбы закрывают пробками, хорошо перемешивают, выдерживают 15 мин и после окрашивания измеряют оптическую плотность в кюветах с рабочей длиной 10 мм. Найденное значение оптической плотности (D_2) является суммарным и включает оптическую плотность, обусловленную цветностью самого жира, а также окраской, развивающейся в результате взаимодействия альдегидов с бензидином. Кюветы после каждого определения трижды промывают чистым растворителем (смесь спирта и хлороформа 1:1) и протирают марлевым тампоном.

Содержание альдегидов, реагирующих с бензидином X (мг коричневого альдегида на 100 г жира, или мг/100 г), вычисляют.

Для приготовления стандартного раствора коричневого альдегида (0,01 мг/л) в бюксу наливают коричневый альдегид, вкладывают в нее небольшую

пипетку, закрывают крышкой и взвешивают с погрешностью не более 0,0002 г. Пользуясь пипеткой, быстро отбирают навеску альдегида массой 0,1 г в другую бюксу. Ввиду большой летучести коричневого альдегида обе бюксы как во время взвешивания, так и до взвешивания должны быть плотно закрыты крышками.

Взятую навеску альдегида при помощи этилового спирта с хлороформом (1:1) количественно переносят из бюксы в мерную колбу на 100 см³, той же смесью доводят до метки и тщательно перемешивают. Отбирают пипеткой 1 см³ приготовленного раствора, помещают в другую мерную колбу на 100 см³, доводят объем до метки добавлением спиртохлороформенной смеси (1:1) и хорошо перемешивают. Полученный раствор является стандартным (в 1 см³ раствора содержится 0,01 мг коричневого альдегида).

Для приготовления рабочих растворов в 10 сухих, предварительно пронумерованных пробирок с притертыми пробками, вносят последовательно от 0,4 до 4,0 см³ стандартного раствора коричневого альдегида (с интервалами 0,4 см³). После этого в пробирки добавляют спиртохлороформенную смесь (1:1) с таким расчетом, чтобы объем полученного раствора в каждой пробирке был равен 10 см³, и хорошо перемешивают содержание пробирок.

Затем в каждые 4 пробирки (в три со стандартом, а в одну – с чистым растворителем – смесью спирта с хлороформом) добавляют по 1 см³ свежеприготовленного раствора бензидина в смеси с этиловым спиртом и ледяной уксусной кислотой (1:1). Пробирки закрывают пробками, хорошо перемешивают их содержимое и выдерживают 15 мин до полного развития окраски. После этого определяют оптическую плотность раствора, содержащих коричневый альдегид, по отношению к чистому растворителю с бензидином фотоэлектроколориметром при длине волны 360 нм, пользуясь кюветой с шириной 10 мм.

При построении градуировочного графика на оси ординат откладывают найденное значение оптической плотности, а по оси абсцисс – процентное содержание коричневого альдегида.

Определение числа омыления

Метод основан на взаимодействии свободных и связанных жирных кислот со щелочью и определении числа омыления, обратным титрованием.

Число омыления – это количество миллиграммов едкого кали (гидроксида калия), вступающего во взаимодействие со всеми свободными и связанными кислотами, находящимися в 1 грамме жира.

Число омыления характеризует природу жира.

Оборудование, материалы, реактив: весы аналитические; баня водяная; холодильник стеклянный (обратный); колбы с притертой пробкой, вместимостью 250 см³; цилиндр мерный, вместимостью 100 см³; 0,5 н раствор гидроокиси калия; 0,5 н раствор соляной кислоты; эфир медицинский; спирт этиловый; 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

Проведение испытания. В коническую колбу на 250—300 см³ отвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,001 г 1,5 – 2 г тщательно перемешанного и профильтрованного жира и приливают из бюретки 25 см³ 0,5 н спиртового раствора гидроокиси калия. Колбу соединяют с обратным холодильником, опускают в кипящую водяную баню и кипятят 1 ч, периодически взбалтывая до полного омыления жира. Об окончании реакции омыления судят по отсутствию помутнения пробы от нескольких капель воды.

К полученному горячему прозрачному мыльному раствору прибавляют 0,5 см³ 1 %-ого раствора фенолфталеина, а при анализе темноокрашенных жиров – 2 см³ 5 %-ого раствора алкалиблау и сразу титруют 0,5 н раствором соляной кислоты до нейтральной реакции. Одновременно проводят контрольный анализ без навески жира.

Определение массовой доли неомыляемых веществ

Метод основан на омылении триглицеридов раствором щелочи, экстракции неомыляемой части этиловым спиртом, обезвоживании и определении их количества взвешиванием.

Оборудование, материалы, реактив: весы аналитические; баня песочная; холодильник стеклянный (обратный); делительная воронка; колбы с притертой пробкой, вместимостью 250 см³; цилиндр мерный, вместимостью 100 см³; 2н раствор гидроокиси калия; эфир медицинский; натрий безводный серноокислый; спирт этиловый; 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

Проведение испытания. В коническую колбу на 250—300 см³ отвешивают 2 – 3 г тщательно перемешанного и профильтрованного жира с абсолютной погрешностью не более 0,001 г. К навеске жира приливают 20 см³ свежеприготовленного 2 н. спиртового раствора КОН и, отметив уровень раствора, омыляют при кипячении. Нагревание проводят на песочной бане с обратным холодильником в течение 2 ч (для рыбьих жиров - 1 ч). Уровень раствора доводят этиловым спиртом до первоначального и прибавляют 80 см³ дистиллированной воды. После этого содержимое колбы нагревают еще 30 мин. Полученный раствор должен быть прозрачным.

После охлаждения раствор количественно переносят в делительную воронку и неомыляемые вещества экстрагируют этиловым эфиром. При образовании эмульсии к эфирному раствору добавляют очень небольшое

количество спирта. Экстракцию проводят в три приема (три раза), расходуя при первой экстракции 50 см³ эфира, а при последующих по 25 см³. Эфирные вытяжки в делительной воронке промывают водой до полного удаления раствора мыла, о чем свидетельствует исчезновение окраски промывных вод при реакции с фенолфталеином.

Эфирные вытяжки количественно переносят через воронку с фильтром и безводным сернокислым натрием в предварительно высушенную и взвешенную колбу.

Эфир отгоняют на водяной бане с холодильником, остатки эфира удаляют на водяной бане без холодильника. Колбу с неомыляемыми веществами высушивают при температуре 100-105 °С до постоянной массы.

4. Установление фракционного состава липидов методом тонкослойной хроматографии

Фракционный состав жира устанавливают тонкослойной хроматографией. Этот метод основан на том, что пробу липидов, нанесенную на пластинку со слоем силикагель-гипс, проявляют в системе растворителей: петролейный эфир - диэтиловый эфир - уксусная кислота в соотношении 90:10:1 с последующей идентификацией полученных пятен. Перед нанесением пробы на расстоянии 10-20 мм от края пластинки острым шпателем проводится черту- стартовая линия. От этой линии вверх по пластинке отмеряются 10-15 см, что представляет собой фронт, т.е. расстояние продвижения системы растворителя.

Пробу липидов около 0,5 г растворяют в 10 мл хлороформа до получения 4-5% - го раствора и микрошприцем наносят в виде отдельных точек, расстояние между которыми составляет 1,5 см. Диаметр пятна должен быть по возможности меньшим, т.к. по мере развития хроматограммы площадь, занимаемая им, возрастает. Кроме того, при наличии слишком больших количеств вещества во время проявления могут образовываться хвосты, затрудняющие идентификацию хроматограммы. В каждом пятне должно содержаться по 0,5-2 мкл хлороформенного раствора, что составляет 20-80 мкг липидов. После нанесения образца растворитель испаряется и пластинка переносится в камеру для проявления. Пластинки с нанесенным образцом помещаются в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами растворителя, в вертикальном положении так, чтобы растворитель не смачивал стартовую полосу и она должна быть на 5-6 мм выше уровня жидкости в камере. Хроматографирование считали законченным, когда фронт растворителя поднимется на 10-15 см, на что затрачивается 30-40 мин. В качестве проявителя была использована фосфорномолибденовая кислота в

виде 5-20% раствора в 96 %-ом этаноле. Для проявления вышеуказанная хроматограмма после испарения растворителя опрыскивалась с помощью пульверизатора раствором фосфорномолибденовой кислоты: через несколько минут нейтральные липиды обнаруживаются в виде белых пятен на голубом фоне, если проявление не наблюдается следует нагревать пластину до появления синих пятен на желтом фоне. Идентификация проводилась по значению R_f (таблица 4).

Таблица 4

Значения идентификации окрашенных пятен по коэффициенту R_f

Класс липидов	Значения R_f , соответствующие классу липидов
углеводороды, каротиноиды, эфиры стеринов, эфиры витамина А	0,9÷1,0
воски	0,9
алкоксидиглицериды	-
триглицериды	0,3÷0,4
α -токоферол	0,19
жирные кислоты	0,18
высшие алифатические спирты	0,15
стерины	0,1
диглицериды	0,08
моноглицериды	0,00
фосфолипиды	на старте

5. Анализ результатов исследований

Результаты исследования химического состава жиросодержащего сырья рекомендуется оформлять по форме таблиц 5 и 6.

Таблица 5

Сравнительная характеристика химического состава жиросодержащего сырья

Объект исследования	Содержание, %				Энергетическая ценность, ккал
	воды (В)	белка (Б)	липидов (Л)	минеральных веществ (М.в.)	

Таблица 6

Выход жира, выделенного из сырья, разными способами

Объект исследования	Содержание жира в исходном сырье, %	Выход жира, %	
		к исходной массе сырья	к массе жира содержащегося в сырье

Данные по определению органолептических показателей качества выделенных жиров оформляются по форме табл. 7.

Таблица 7

Органолептические показатели качества выделенных жиров

Наименование показателя	Требования технической документации	Характеристика показателя качества исследуемого образца жира
Внешний вид		
Цвет		
Запах		

Данные по определению показателей качества липидов оформляются по форме табл. 8

Таблица 8

Качественные показатели жира длительного хранения

Наименование показателя	Объект исследования	Требования технической документации
Кислотное число, мг КОН/г		
Пероксидное число, %I ₂		
Йодное число г/100г		
Альдегидное число, мг/100 г		
Число омыления, мг КОН/г		
Неомыляемые вещества, %		

Данные по определению классов липидов оформляются по форме табл.

9

Таблица 9

Идентифицированные классы липидов по коэффициенту R_f

Класс липидов	Значения R _f , соответствующие классу липидов

На основании полученных данных делают выводы.

6. Вопросы для самоконтроля:

1. Классификация липидов и признаки их разделения?
2. Физиологическое значение триглицеридов, его определение?
3. Характеристика основных групп фосфолипидов, их отличительные особенности?

4. Отличительная особенность липидов водных организмов от липидов наземных животных и растений?
5. Охарактеризуйте методы определения содержания липидов.
6. Приведете способы выделения липидов?
7. Охарактеризуйте методы определения кислотного, йодного, перекисного, альдегидного чисел жиров?
8. Приведете методы определения числа омыления и содержания неомыляемых веществ в жирах?
9. Методы определения фракционного состава липидов?
10. Идентификация хроматограмм?

Лабораторная работа № 3 Установление сравнительных уровней содержания углеводов в образцах покровной и костной тканей животных, птиц и водных объектов посредством установления их химических составов

Цель работы: Исследовать химический состав покровной и костной ткани животных, птиц и водных объектов и определить содержание углеводов расчётным методом.

Задачи:

1. Изучить органолептические показатели качества покровных тканей животных, птиц и водных объектов и требования СанПиН 2.3.2.1078 на исследуемый объект.
2. Осуществить при необходимости отделение от кожного покрова щетины, перьев и т.д., и провести измельчение покровной ткани.
3. Изучить химический состав покровной ткани животных, птиц и водных объектов.
5. Установить содержание углеводов расчётным методом.
4. Определить содержание гиалуроновой кислоты в покровной ткани животного и водного сырья. Исследовать органолептические и физикохимические характеристики (рН, вязкость) водного экстракта, содержащего гиалуроновую кислоту.
5. Определить содержание хондроитинсульфата в хрящевой или костной тканях сырья животного и водного происхождения*.
5. Оформить полученные данные в табличной форме, проанализировать и сформулировать выводы.

**Задачи, методы исследования и методики, помеченные звёздочкой* выполняются студентами по дополнительному заданию преподавателя для углублённого изучения курса дисциплины.*

Объекты исследования: покровная ткань свинины, говядины, конины и т.д., птицы, кожа, костная, хрящевая ткани рыб, покровная ткань (панцирьсодержащее сырьё (ПСС)) речных раков.

Методы исследований.

Отбор проб проводили в соответствии с ГОСТ 31339-2006 «Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р 51447-99 «Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб», ГОСТ 31467-2012 «Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы отбора проб и подготовка их к испытаниям». ГОСТ 7269 «Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести». Определение органолептических показателей - ГОСТ 9959-91 «Продукты мясные. Общие условия проведения органолептической оценки». ГОСТ 32244-2013 «Субпродукты мясные обработанные. Технические условия». Определение содержания, %: воды, белка, минеральных веществ, липидов в покровных тканях водных биоресурсов проводят по ГОСТ 7636 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа». Определение содержания в покровной ткани животных: воды – по ГОСТ Р 51479-99 «Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли влаги», жира - по ГОСТ 23042 «Мясо и мясные продукты. Методы определения жира», белка – по ГОСТ 25011-81 «Мясо и мясные продукты. Методы определения белка», золы – по ГОСТ 31727-2012 «Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли общей золы».

Порядок выполнения работы.

1. Необходимое оборудование, инструменты и реактивы:

- Ножи;
- Ножницы;
- деревянная доска;
- весы аналитические;
- часы;
- бюксы;
- Эксикатор;
- щипцы тигельные;
- аппарат Чижовой;
- сушильный шкаф;
- тигли; □ муфельная печь;
- аппарат Сокслета;

- колбы стеклянные конические на 250 см³;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- колбы для минерализации, установка для минерализации органических веществ;

- аппарат для отгонки паров аммиака;
- перекись водорода (х. ч.) по ТУ 6-09-4211-85;
- смешанный индикатор;
- эфир медицинский по Госфармакопее РФ (серный эфир), H₂SO₄

ч. или х.

ч. по ГОСТ 4204-77, NaOH ч. д. а. по ГОСТ 4328-77 (прокипяченный 33 %-ный раствор);

- КОН ч. д. а. по ГОСТ 24363-80, 0.02 н раствор;
- вода дистиллированная безаммиачная, приготовленная по ГОСТ 4517-75;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;
- рН-метр типа рН-673 или другого типа, обеспечивающий измерения в пределах рН 1-14.;
- Реактив ацетилацетон-триэтиламина ;
- Борнокислый буфер, содержащий K₂B₄O₇·4H₂O (50,2 g./l.) и H₃BO₃ (40,6 g./l.), имеющий рН 8-0;
- Реактив Эрлиха.

2. Определение химических показателей объекта исследования

Описание методов анализа по определению содержания, %: воды, белка, липидов, минеральных веществ приведено в лабораторной работе № 1 данных методических указаний.

Определение содержания углеводов (У, %) в покровной ткан проводится по формуле (1):

$$У = 100\% - (Б + Ж + М.в.) \quad (1)$$

где Б – массовая доля белковых веществ в покровной ткани, %;

Ж- массовая доля жира (липидов) в покровной ткани, %;

М.в. – массовая доля минеральных веществ, %

Определение энергетической ценности

Энергетическая ценность указывает, какое количество энергии можно получить из того или иного продукта. Она указывается в килоджоулях (кДж) или в еще используемой, но устаревшей единице – килокалориях (ккал).

Пересчет из килокалорий в килоджоули и наоборот осуществляется согласно следующим соотношениям: 1 ккал = 4,1868 кДж; 1 кДж = 0,2388 ккал.

Для подсчета энергетической ценности найденное количество белков, жиров и углеводов умножается соответственно на энергетические коэффициенты 4,0; 9,0; 4,0 ккал. Сумма произведений составит энергетическую ценность сырья или продукта по формуле (2):

$$Ц = Б * 4,0 + Ж * 9,0 + У * 4,0, \quad (2)$$

где Б- количество белков; Ж-
количество жира;
У- количество углеводов.

Определение содержания гиалуроновой кислоты

Определение содержания гиалуроновой кислоты в покровной ткани сырья животного и водного происхождения. Кожи рыб или шкуры животных, птиц подвергают промывке в холодной проточной воде температурой 18°C в течение 10 мин с целью удаления с поверхности сырья слизи, загрязнений, извлечения балластных глобулиновых и альбуминовых белков. Далее покровную ткань измельчают до размера 2-3 мм. Берут навеску массой 5-10 г, добавляют воды при соотношении (ГМ 1:1), нагревают смесь в термомате до 40-45 °C и выдерживают 50 мин при указанной температуре и периодическом перемешивании. По истечении указанного времени жидкую фракцию отфильтровывают и добавляют к ней 96-% этиловый спирт в соотношении необходимом для осаждения гиалуроновой кислоты. Полученный осадок гиалуроновой кислоты фильтруем через заранее высушенный до постоянной массы и взвешенный беззольный фильтр. Фильтр с осадком сушим до постоянной массы при температуре 100-105 °C.

Определение кинематической, динамической, удельной и приведенной вязкости.

Кинематическую вязкость определяют при помощи прибора вискозиметра (рис.1).

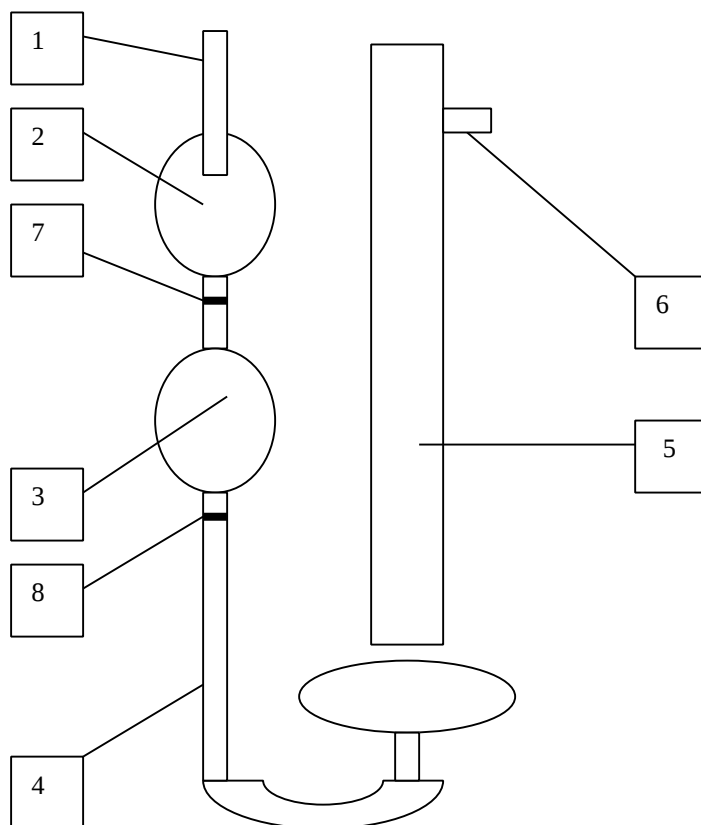


Рис. 1 — Устройство вискозиметра ВПЖ-4

1 — колено; 2 — верхний резервуар; 3 — нижний резервуар; 4 — капилляр; 5 — колено; 6 — отводная трубка; 7 — верхний уровень; 8 — нижний уровень.

Порядок работы на вискозиметре. Для измерения времени истечения жидкости на отводную трубку (6) надевают резиновый шланг. Зажав пальцем верхнее отверстие в колене (5) и перевернув вискозиметр, опускают колено (1) в сосуд с жидкостью и засасывают ее (с помощью груши, водоструйным насосом или иным способом) до заполнения верхнего резервуара (2). Затем вискозиметр переворачивают в нормальное положение и открывают отверстие колена (5). Жидко начинает стекать вниз. При достижении уровня жидкости границы верхнего уровня (7) включают секундомер, который останавливают при достижении жидкости границы нижнего уровня (8).

Опыт повторяют не менее 3-х раз, затем вычисляют среднее арифметическое. Кинематическую вязкость рассчитывают

Для расчета динамической вязкости необходимо определить плотность жидкости. Определение плотности исследуемый раствор наливают в мерный цилиндр на 100 см³ с широким горлом и погружают в жидкость последовательно несколько ареометров разных пределов измерения до установления ее плотности.

Удельную вязкость определяют

Определение pH исследуемого раствора лакмусовой бумагой или при помощи pH-метра

Метод основан на определении pH раствора лакмусовой бумагой. В исследуемый раствор полимера опускают лакмусовую бумагу и сравнивают со шкалой сравнения, устанавливая pH солевого раствора.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 5 %.

Метод основан на определении pH раствора специальным прибором — pH-метром. В исследуемый раствор полимера опускают электрод, его выдерживают до установления постоянной величины (5-10 минут).

ВНИМАНИЕ: после каждого определения электрод необходимо ополаскивать дистиллированной водой.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0.1 %.

Метод получения хондроитинсульфата*

Хрящевую ткань товарного осетра или костную ткань толстолобика (можно использовать хрящевую и костную ткани других видов рыб) в количестве до 100 г поместить в ёмкость (колба, стакан и т.д. объемом 500 мл) из термостойкого стекла добавить воду в соотношении (ГМ) 1:3, всю смесь нагреть до температуры кипения и подвергнуть тепловой обработке в течение 20 или 40 мин соответственно. По окончании варки верхний слой бульона, содержащий жир слить методом декантации. Хрящевую или костную ткани отделить от оставшегося бульона фильтрованием и подсушить на фильтровальной бумаге при 20-22°C. Подсушенные хрящевую и костную ткани обезжировать 2 раза по 30 мин. при температуре 20-22°C в соотношении хрящевая или костная ткань-спирт (1:3). Затем хрящевую или костную ткани отделить от спирта и подсушить на фильтровальной бумаге. Далее обезжиренные и подсушенные хрящевую или костную ткани залить по водой в соотношении (1:8) и в полученную суспензию внести ферментный препарат коллагеназы в количестве 0,2% к их общей массе.

Ферментацию (гидролиз) осуществлять в течение 20-22 ч при температуре 42°C, после этого полученный гидролизат отделить от непрогидролизованной плотной части фильтрованием, через капроновое сито с размером пор 0,2 мм. Отфильтрованный гидролизат подвергнуть осаждению белка при pH 3-4 путем подкисления их 10%-ным раствором соляной кислоты. Подкисленный гидролизат подвергнуть фильтрованию. Затем гидролизат направить на очистку от солей и низкомолекулярных веществ посредством диализа через двойной слой натуральной колбасной оболочки или целлофановую пленку против дистиллированной воды при температуре 20-22°C в течение 48 ч.

Очищенные гидролизаты при необходимости подвергают концентрированию с помощью вакуумного ротационного испарителя при температуре 40°C или сразу направляют на конвективную сушку тонким слоем при температуре 30-35°C.

Методика определения хондроитинсульфата.

Использован фотометрический способ, основанный на определении галактозамина, который образуется при полном кислотном гидролизе хондроитина.

Определение D-галактозамина в присутствии D-глюкозамина.

Техника проведения анализа. Пробоподготовка. На первом этапе проводился кислотный гидролиз препаратов хондроитина сульфата следующим образом. Образец хондроитина сульфата помещался в колбу со стеклянной пробкой, добавлялась конц. соляная кислота (из расчета 1 мл кислоты на 0,01 г образца). Колба нагревалась на водяной бане при перемешивании от 30 до 50 минут, испарившаяся кислота возвращалась в колбу с помощью обратного холодильника. Пробы гидролизата хондроитина сульфата (1 мл) отбирались из реакционной ёмкости через определённые промежутки времени, охлаждались до -20 °C, затем высушивались конвективным способом (рекомендуется под вакуумом 0,1 ГПа при температуре -48 °C. Сухой гидролизат растворялся в дистиллированной воде и снова сушился для удаления остатков соляной кислоты. Полученный гидролизат хондроитина сульфата растворялся в 20 мл бидистиллированной воды.

Образцы, содержащие 10-50 мкг галактозамина, в объеме, не превышающем 1,0 мл (лучше 0,5 мл.), высушиваются при 50° под вакуумом на водяной бане в пробирках (колбах) со стеклянными шлифами, связанными с водным насосом. Избыток соляной кислоты в продуктах гидролиза удаляется на этом этапе и нейтрализация не требуется. Добавляется порция (1,0 мл.) реактива ацетилацетона-триэтиламина, закрытые пробкой пробирки выдерживаются 16 часов в сушильном шкафу при 55 °. Остатки ацетилацетона и триэтиламина не воздействуют на следующих этапах проведения анализа. Закрытые пробкой пробирки нагреваются 20 мин. с 6 мл борнокислого буфера на кипящей водяной бане. Пробирки охлаждаются до 35 °, их содержимое перемещается в перегонный аппарат. Первые 3,0 мл (в оригинале – 2 мл) дистиллята собираются мерной колбе объемом 10 мл, содержащей 8 мл реактива р- диметиламинобензальдегида (реактива Эрлиха). Пробирки с полученным раствором помещаются в темное место. Вскоре развивается цвет, который достигает максимума через 30 мин., устойчивый в течение нескольких часов. Оптическое поглощение определяется при длине

волны 545 нм на спектрофотометре. Установленная величина поглощения при 545 нм - линейная функция количества аминасахара. Значения величины поглощения 1 ммоль. аминасахара в 1,0 мл последнего раствора был 14200 для D-галактозамина и 180 для D-глюкозамина.

Методика постановки эксперимента представляет собой краткую запись порядка постановки эксперимента, содержащую выбранный способ обработки, параметры и последовательность технологических операций, использованных при переработке покровной ткани сырья животного и водного происхождения.

3. Анализ результатов исследований

Результаты исследования рекомендуется оформлять по форме таблицы 1

Таблица 1

Органолептические показатели качества покровной ткани

Наименование показателя	Характеристика показателя качества	
	по требованию стандарта	исследуемого образца
Внешний вид		
Цвет		
Запах		
Показатели *		

* Показатели качества в соответствии с требованиями действующего стандарта на выданный образец

Данные по химическому составу покровной ткани сырья животного и водного происхождения сводятся и оформляются по форме табл. 2.

Таблица 2

Сравнительная характеристика химического состава покровной ткани сырья животного и водного происхождения

Объект исследования	Содержание, %					Энергетическая ценность, ккал
	воды (В)	белка (Б)	жира (Ж)	минеральных веществ (М.в.)	углеводов (У)	

Органолептическая и физико-химические характеристики водного раствора гиалуроновой кислоты приводятся по форме табл.3.

Таблица 3

Органолептические и физико-химические показатели качества водного раствора гиалуроновой кислоты

Наименование показателя	Исследуемый образец
Внешний вид	
Цвет	
Запах	

рН р-ра	
Кинематическая вязкость, мм ² /с	
Динамическая вязкость, Па	
Удельная вязкость	
Приведённая вязкость	
Содержание гиалуроновой кислоты, %	

Органолептические и физико-химические характеристики гидролизата, содержащего хондроитинсульфат приводятся по форме табл. 4.

Таблица 4

**Органолептические и физико-химические показатели гидролизата,
содержащего хондроитинсульфат**

Наименование показателя	Исследуемый образец
Внешний вид	
Цвет	
Запах	
рН р-ра	
Кинематическая вязкость, мм ² /с	
Динамическая вязкость, Па	
Удельная вязкость	
Приведённая вязкость	
Содержание хондроитинсульфата, %	

На основании данных таблиц делают выводы.

4. Вопросы для самоконтроля

1. Дайте общую характеристику классу органических веществ углеводам?
2. Простые углеводы и их свойства?
3. Сложные углеводы и их свойства?
4. Особенность углеводов мышечной ткани сырья животного происхождения?
5. Классификация, строение, химический состав и свойства рыбных кож?
6. Особенности углеводного состава рыбных кож?
7. Особенности углеводного состава костной ткани?
8. Приведите характеристику полисахарида гликогена (животный крахмал), содержание его в животном сырье и направления использования?
9. Приведите характеристику полисахарида гиаларина, содержание его в тканях печени животного сырья и направления использования?

10. Приведите характеристику гиалуроновой кислоты и направления её использования?

11. Характеристика хондроитинсульфата, его получение и применение?

Лабораторная работа № 4 Установление уровня содержания полисахарида – хитина в панцирьсодержащем сырье (ПСС) ракообразных, его органолептическая, физико-химическая характеристики

Цель работы: Определить уровень содержания хитина в ПСС речных раков и пресноводных креветок, исследовать его органолептические и физико-химические характеристики.

Задачи:

1. Определить содержание общего (ОА), небелкового (НБА), белкового азота (БА) и хитина в ПСС ракообразных.

2. Исследовать органолептические и физико-химические характеристики хитина (содержание воды, белка, золы).

3. Получить из хитина посредством проведения деацетилирования хитозан, исследовать его органолептические и физико-химические характеристики*.

4. Получить из хитина посредством кислотного гидролиза глюкозамин гидрохлорид, исследовать его органолептические и физико-химические характеристики*.

5. Оформить полученные данные в табличной форме, проанализировать и сформулировать выводы.

* Данные задачи для выполнения лабораторной работы выдаются группе студентов по заданию преподавателя для углублённого изучения курса дисциплины.

Объекты исследования: панцирь шейки, карапакса и клешней, (ПСС КС), панцирь головогрудии ножек (ПСС КП).

Методы исследований.

Отбор проб ПСС проводят в соответствии с ГОСТ 31339-2006 «Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб». Определение содержания, %: воды, белка (ОА·6,25), минеральных веществ, липидов проводят по ГОСТ 7636 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа».

Описание методов анализа по определению содержания, %: воды, белка, липидов, минеральных веществ, небелковый азот (НБА), белкового азота (БА) приведено в лабораторной работе № 1 данных методических указаний.

Порядок выполнения работы.

1. Необходимое оборудование, инструменты и реактивы:

- Ножи;
- Ножницы;
- деревянная доска;
- весы аналитические;
- часы;
- бюксы;
- Эксикатор;
- щипцы тигельные;
- аппарат Чижовой;
- сушильный шкаф;
- тигли;
- муфельная печь;
- аппарат Сокслета;
- колбы стеклянные конические на 250 см³;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- колбы для минерализации, установка для минерализации органических веществ;
- аппарат для отгонки паров аммиака;
- перекись водорода (х. ч.) по ТУ 6-09-4211-85;
- смешанный индикатор; □ эфир медицинский по Госфармакопее РФ (серный эфир), H₂SO₄ ч. или х. ч. по ГОСТ 4204-77, NaOH ч. д. а. по ГОСТ 4328-77 (прокипяченный 33 %-ный раствор);
- КОН ч. д. а. по ГОСТ 24363-80, 0.02 н раствор;
- вода дистиллированная безаммиачная, приготовленная по ГОСТ 4517-75; □ вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72; □ ацетон ГОСТ 2768-84.
- H₂SO₄ ч. или х. ч. по ГОСТ 4204-77;
- NaOH ч. д. а. по ГОСТ 4328-77 (прокипяченный 33 %-ный раствор)

2. Определение хитина и хитозана, его характеристики

Определение содержания хитина в ПСС речного рака.

Навеску ПСС массой 3-5 г взвешивают тугоплавкую колбу объемом 250 мл и для проведения деминерализации добавляют 10%-ный раствор соляной

кислоты (HCl) в соотношении 1:20. Смесь выдерживалась при комнатной температуре (20-25 °C) в течение часа при постоянном перемешивании. Осадок отделяют фильтрованием или центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 минут и промывают дисцилированной водой до pH 6-6,5. К промытому в колбе осадку добавляют 10% раствор NaOH закрывают простой пластиковой пробкой или пробкой с обратным холодильником и выдерживают на кипящей бане в течение 1,5 часа при периодическом перемешивании для проведения депротеинирования. Осадок отделяют фильтрованием или центрифугированием при тех же условиях и промывают дисцилированной водой до pH 7,5-8. Далее повторно обрабатывают кислотой, затем щёлочью при тех же условиях. Полученный осадок обрабатывают ацетоном до полного обесцвечивания. Обесцвеченный осадок отделялся фильтрованием через предварительно высушенный и взвешенный складчатый фильтр. Фильтр с осадком высушивался в сушильном шкафу при 105 °C до постоянной массы.

Рассчитанную навеску хитина взвешивали до 0,0002 г и переносили в колбу 100 мл. Цилиндром в колбу вносили 30 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и выдерживали смесь при 95–98°C в течение 1,5 часа при периодическом перемешивании. По истечению указанного времени смесь фильтровали через предварительно высушенный и взвешенный складчатый фильтр. Осадок на фильтре промывали горячей дистиллированной водой до pH 7. Фильтр с осадком высушивали при температуре 105°C до постоянной массы.

Способ получения хитозана из хитина*.

Навеску хитина массой от 1 до 5 г взвешивают в тугоплавкую колбу объёмом 250 мл и добавляют 50%-ный раствор щелочи (NaOH) в соотношении 1:6 – 1:10, подвергают деацетилированию, при температуре 95–98°C и продолжительности 2 ч. В полученную суспензию добавляют воды в 10-20 кратном количестве (чтобы не порвался фильтр от раствора с сильнощелочной средой) и фильтруют через бумажный обеззоленный фильтр. Хитозан промывают водой в соотношении 1:10 до pH 7,0 и высушивают при температуре 55–60°C. Определяют выход хитозана к массе хитина, %.

Качество полученного хитозана определяется по комплексу показателей.

Определение степени деацетилирования хитозана методом потенциометрического титрования*

Определение степени деацетилирования основано на обратном алкалометрическом потенциометрическом титровании хлористого водорода, связанного с аминогруппами молекул хитозана, в солянокислом растворе.

Определение степени деацетилирования проводили с помощью стеклянной бюретки и рН-метра.

Приготовление растворов

Приготовление 0,1 моль/дм³ раствора гидроксида натрия: 4 г кристаллического гидроксида натрия растворяли в дистиллированной воде и доводили объем до 1 дм³.

Приготовление 0,1 моль/дм³ раствора соляной кислоты. 10 г (8,47 см³) концентрированной соляной кислоты растворяли в дистиллированной воде и доводили объем до 1 дм³.

Приготовление 0,05 моль/дм³ раствора тетрабората натрия точной концентрации. Для приготовления 250 см³ 0,05 моль/дм³ (0,1 н.) раствора тетрабората натрия навеску перекристаллизованной соли массой от 4,766 до 4,768 г, взвешенную с абсолютной погрешностью не более 0,0002 г, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 250 см³. В колбу наливали 100-150 см³ дистиллированной воды при температуре от 50 до 60 °С и перемешивали до полного растворения кристаллов соли. Затем колбу с раствором охлаждали до температуры 20 °С и доводили объём раствора до 250 см³ дистиллированной водой.

Определение точной концентрации раствора соляной кислоты. Точную концентрацию раствора соляной кислоты определяли потенциометрическим титрованием раствора тетрабората натрия точной концентрации.

В стакан вместимостью 100 см³ отбирали пипеткой 10 см³ 0,05 моль/дм³ раствора тетрабората натрия точной концентрации и добавляли 40 см³ дистиллированной воды.

Титровали раствор тетрабората натрия раствором соляной кислоты до рН5,40.

За окончательный результат принимали среднее арифметическое значение результатов трёх параллельных определений, допускаемое расхождение между которыми не превышало 0,001 моль/дм³.

Определение точной концентрации раствора гидроксида натрия. Точную концентрацию раствора гидроксида натрия определяли потенциометрическим титрованием раствора соляной кислоты точной концентрации.

В стакан вместимостью 100 см³ отбирали пипеткой 10 см³ 0,1 моль/дм³ раствора соляной кислоты точной концентрации и добавляли 40 см³ дистиллированной воды.

Титровали раствор соляной кислоты раствором гидроксида натрия до рН7,0.

За окончательный результат принимали среднее арифметическое значение результатов трёх параллельных определений, допускаемое расхождение между которыми не превышало 0,001 моль/дм³.

Подготовка пробы. Навеску исследуемого образца массой от 0,199 до 0,201 г, взвешенную с абсолютной погрешностью не более 0,0002 г, количественно переносили в стакан, вместимостью 100 см³, добавляли 10 см³ 0,1 моль/дм³ раствора соляной кислоты, точной концентрации. Смесь выдерживали 2-3 часа, затем добавляли ещё 10 см³ раствора кислоты и оставляли на 20-24 часа, закрыв стакан крышкой.

После полного растворения образца в стакан с раствором добавляли 40 см³ дистиллированной воды. Раствор перемешивали в течение 5 мин. Скорость перемешивания выбирали максимальной так, чтобы электроды были погружены в раствор, и не происходило образование воздушных пузырьков.

Проведение анализа. Раствор образца титровали раствором гидроксида натрия точной концентрации. Титрование проводят медленно, избегая быстрого осаждения хитозана. После добавления очередной порции раствора щелочи измерение рН проводят после установления постоянных показателей рН-метра.

Потенциометрическое титрование проводили при помощи иономера Анион 4151 (НПП «Инфраспек-Аналит», Россия) с шагом 0,1 см³. Полученную кривую (зависимость рН раствора от объема титранта) графически обрабатывали и находили объемы титранта, соответствующие точкам эквивалентности соляной кислоты и солянокислого хитозана (V_1 и V_2).

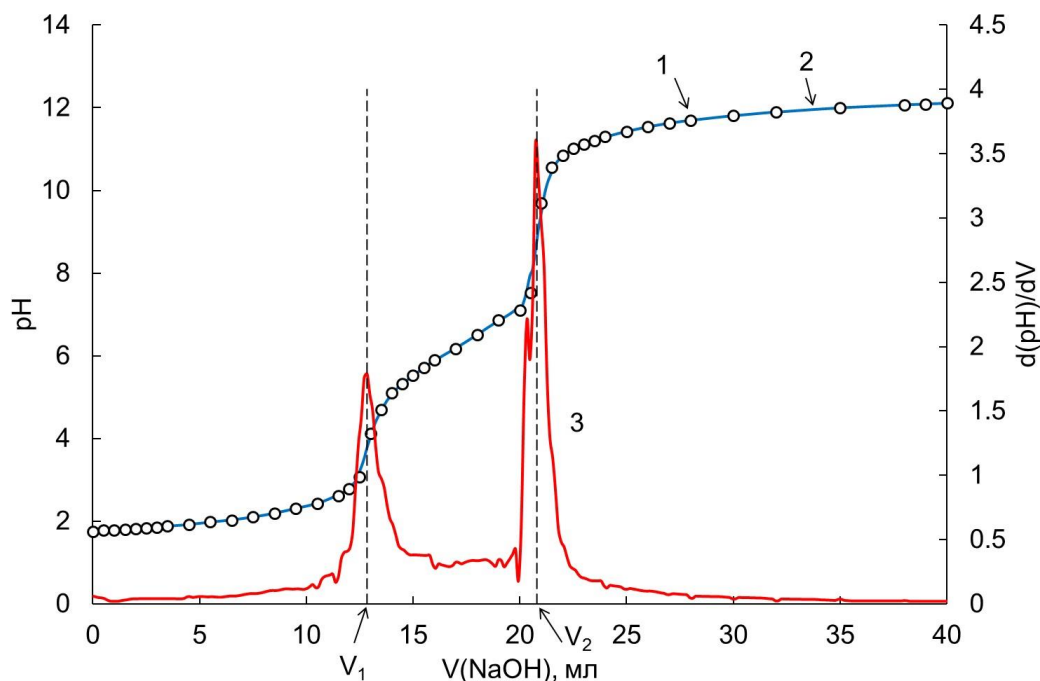


Рис. 1. Потенциометрическое титрование раствора хитозана в соляной кислоте раствором гидроксида натрия. 1 – экспериментальные точки титрования, 2 – сглаженная кривая титрования с постоянным шагом, 3 – первая производная

За окончательный результат принимали среднее арифметическое значение результатов трёх параллельных определений, относительное расхождение между которыми не превышало 2 %.

Методика определения содержания нерастворимых в хитозане веществ*

0,1 г хитозана растворяют в 1% растворе уксусной кислоты (100 мл). Раствор с хитозаном фильтруют в предварительно высушенный в течение 2-х часов при 105 °С (в течение 1 часа при 130 °С или 10-15 мин при 160 °С) и затем взвешенный бумажный фильтр. Стенки колбы после пропускания раствора омывают 2 раза 50 мл 1% раствора уксусной кислоты, который пропускают через тот же фильтр. После фильтрации фильтр высушивают сначала под вытяжной вентиляцией в течение 2-х часов при температуре окружающего воздуха, затем в сушильном шкафу при температуре при 105 °С в течение 2-ух часов (при 130 °С в течение 1 часа или при 160 °С 10-15 мин) до постоянной массы. Фильтр снова взвешивают. Количество нерастворимых в хитозана веществ рассчитывают в % по формуле

Динамическую вязкость раствора хитозана с массовой долей 1% в 1%ном растворе уксусной кислоты определяли с помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-4 с диаметром капилляра 2,37 мм.

Для определения плотности хитозана использовали объемно-массовый метод. Метод основан на измерении объема вспомогательной жидкости,

вытесненной твердым веществом. Плотность вещества ρ определялась по формуле (11):

$$\rho = m / V \quad (11)$$

где m - масса навески твердого вещества, кг; V - объем вытесненной вспомогательной жидкости, м^3 .

Методика определения молекулярной массы хитозана*

Определение молекулярной массы хитозанов осуществляют методом капиллярной вискозиметрии с помощью вискозиметра диаметром капилляра 0.82 мм (Немцев С.В., 1997).

Капиллярную вискозиметрию растворов хитозанов использовали при определении характеристической вязкости (η), определяющей основной прирост вязкости растворителя при введении в него полимера (Скляр А.М. и др., 1981). Вязкость растворов хитозана измеряли при $25 \pm 0,05^\circ\text{C}$ в диапазоне концентраций 0,025-0,1 г/Дл. Скляром А.М. (1981 г.) было показано, что в этом диапазоне вязкость растворов хитозана практически не зависит от скорости сдвига.

Образцы хитозана для измерений (η) готовили растворением навески в 0,2 М ацетатном буфере в течение 2 ч. Такая продолжительность растворения необходима для растворения высокомолекулярных образцов. Раствор хитозана с концентрацией 0,1 г/Дл помещали в приемную емкость вискозиметра и термостатировали при $25 \pm 0,05^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, затем производили измерение вязкости до получения не менее двух сходящихся результатов. После этого проводили разбавление пробы термостатированным растворителем до концентрации 0,07 г/Дл и снова проводили измерение. Таким же образом проводили последовательное разведение раствора до 0,05 г/Дл и 0,025 г/Дл с измерением его вязкости.

Среднее воспроизводимое значение продолжительности истечения раствора использовано для расчета удельной вязкости

Построением графической зависимости $\eta_{\text{уд}}$ от c , представляющей собой прямую линию, интерполируя которую на ось ординат, было получено значение характеристической вязкости (η).

Средняя молекулярная масса хитозана определялась по уравнению Марка-Куна-Хаувинга, приведенному ниже (формула):

$$M_{\text{МЗХ}} = \text{antilg} \frac{\log \eta + 3,8601}{0,850}$$

где $M_{\text{МЗХ}}$ – средняя молекулярная масса, кДа;

η – характеристическая вязкость раствора мм²/с.

Способ получения глюкозамин гидрохлорида из хитина*

Навеску хитина определённой массы (5 г) взвешивают в термостойкую плоскодонную колбу на 250 мл и добавляют 11 н р-р HCl в соотношении (ГМ) 1:5 и выдерживают при температуре 95-98 °С в течении 3,5 часа для проведения жёсткого кислотного гидролиза. Охлаждают гидролизат до температуры 20°С добавляют активированный уголь в соотношении хитин активированный уголь (1:0,5) и дистиллированную воду ГМ 1:5 проводят обесцвечивание гидролизата при температуре 90-95 °С в течение 1,5 часа. Обесцвеченный гидролизат фильтруют через бумажный фильтр, а активированный уголь промывают дистиллированной водой температурой 60°С. Профильтрованный гидролизат упаривают до начала кристаллизации в течение 5 часов при температуре 60°С, удаляют соляную кислоту промывают кристаллы 96%-ным этиловым спиртом и досушивают при температуре 40°С в течение 3 часов до остаточной влажности не более 10%.

Качественные показатели глюкозамина гидрохлорида устанавливают согласно методикам, приведённым в ФСП - 42 0314147801 «Глюкозамина гидрохлорид». Проводится определение растворимости, прозрачности, рН (потенциометрическим методом), количественное определение (по методу Кьельдаля и соответствующему пересчету - 1 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной соответствует 0,021563 г глюкозамина гидрохлорида), потери массы при высушивании.

Методика постановки эксперимента представляет собой краткую запись порядка постановки эксперимента, содержащую выбранный способ обработки, параметры и последовательность технологических операций, использованных при переработке покровной ткани сырья животного и водного происхождения.

3. Анализ результатов исследований

Данные по химическому составу рекомендуется оформлять по форме таблицы 1.

Таблица 1

Химический состав заготовленного ПСС ракообразных

Объект исследования	Содержание, % и мг/100 г			
	общего азота (ОА)	небелкового азота (НБА)	белкового азота (БА)	азота хитина

--	--	--	--	--

Качественные характеристики хитина приводятся по форме табл. 2

Таблица 2

Качественные характеристики хитина

Объект исследования	Содержание, %				
	воды (В)	белка (Б)	липидов (Л)	зола (З)	хитина (Х)
<i>Хитин из (наименование вида сырья)</i>					

Качественные характеристики хитозана приводятся по форме табл.3

Качественные характеристики хитозана

Наименование показателя	Опытный образец (хитозан из.....)
Молекулярная масса, кДа	
Степень деацетилирования, %	
Характеристическая вязкость $[\eta]$, дл/г	
Содержание, %:	
Воды минеральных	
веществ	
нерастворимых	
веществ	

Качественные характеристики глюкозамингидрохлорида приводятся по форме табл. 4.

Таблица 4

Качественные показатели глюкозамина гидрохлорида

Показатели	Требования согласно ФС - 42 0314147801	Опытный образец глюкозамин гидрохлорида
внешний вид	белый кристаллический порошок без запаха	
вкус	сладковато-солонватый	
растворимость	легко растворим в воде, малорастворим в спирте 95 %, не растворим в хлороформе	
прозрачность р-р	20 % водный раствор должен быть прозрачным	
рН	от 2,5 до 4,0	
потеря массы при высушивании	не более 0,5 %	
количественное определение	не менее 99,0 %	

На основании данных таблиц делают выводы.

4. Вопросы для самоконтроля

1. Виды хитинсодержащего сырья?
2. Характеристика панцирьсодержащего сырья ракообразных?
3. Дайте характеристику способам получения хитина из разных видов хитинсодержащего сырья (на примере 2-3 способов)?
4. Приведите способы получения хитозана из хитина?
5. Классификация, виды и назначение хитозана?
6. Как определяется растворимость хитозана и количество нерастворимых веществ?
7. Как осуществляется определение степени деацетилирования (СДА) хитозана?

8. Как осуществляется определение молекулярной массы (ММ) хитозана?
9. Приведите способы получения глюкозамина гидрохлорида?
10. Приведите характеристику органолептических и физико-химических свойств глюкозамин гидрохлорида?

Лабораторная работа № 5 Установление уровня содержания полисахарида - зостерина в высушенной морской траве-зостере с разными сроками хранения при температуре окружающей среды, его органолептическая и физико-химическая характеристики

Цель работы: Установить уровень содержания полисахарида –зостерина в высушенной морской траве-зостере и исследовать его органолептические, физико-химические характеристики.

Задачи:

1. Изучить требования стандарта и СанПиН на исследуемый объект. Определить органолептические показатели качества морской травы.
2. Изучить физико-химические характеристики морской травы: содержание воды, степень набухания (восстанавливаемости).
3. Определить химический состав морской травы зостеры, пресноводных растений рдеста пронзённолистного, гребенчатого.
4. Определить содержание (углеводов) сахарозы, пектиновых веществ в морской траве и пресноводных травах.
4. Исследовать органолептические, физико-химические характеристики зостерина.
5. Сформулировать выводы после проведённой работы в целом.

Объекты исследования: морская трава зостера, рдест пронзённолистный, рдест гребенчатый.

Методы исследований.

Отбор проб и определение органолептических показателей качества водных растений проводят в соответствии с ГОСТ 20438 «Водоросли, травы морские и продукты их переработки. Правила приемки. Методы органолептической оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний». Химические показатели заготовленных воздушно-сухих образцов (массовая доля воды, минеральные вещества) зостеры и рдеста определяют по ГОСТ 26185-84 «Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки». Содержание азотистых, растворимых в эфире веществ – по ГОСТ 7636-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки». Содержание фракций

растворимых и легкогидролизуемых углеводов в сырье и в гидролизатах определяют в соответствии с ГОСТ 26176-84 «...Метод определения растворимых и легкогидролизуемых углеводов».

Уровень клетчатки в сырье устанавливают по ГОСТ 13496.2-91 «Метод определения сырой клетчатки». Содержание пектиновых веществ в воздушно-сухих образцах определяют весовым кальций-пектантным методом, который основан на осаждении пектиновых веществ в виде кальциевых солей после гидролиза исследуемого объекта 0,4%-ным раствором гидроксида натрия (NaOH) (Донченко, 2000).

Порядок выполнения работы.

1. Необходимое оборудование, инструменты и реактивы:

- Ножи;
- Ножницы;
- деревянная доска;
- весы аналитические;
- часы;
- бюксы;
- Эксикатор;
- щипцы тигельные;
- аппарат Чижовой;
- сушильный шкаф;
- тигли;
- муфельная печь;
- аппарат Сокслета;
- колбы стеклянные конические на 250 см³;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- колбы для минерализации, установка для минерализации органических веществ;
- аппарат для отгонки паров аммиака;
- перекись водорода (х. ч.) по ТУ 6-09-4211-85;
- смешанный индикатор; П эфир медицинский по Госфармакопее РФ (серный эфир), H₂SO₄ ч. или х. ч. по ГОСТ 4204-77, NaOH ч. д. а. по ГОСТ 4328-77 (прокипяченный 33 %-ный раствор);
- КОН ч. д. а. по ГОСТ 24363-80, 0.02 н раствор;

- вода дистиллированная безаммиачная, приготовленная по ГОСТ 4517-75;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328 8%-ный раствор и 2,5 н раствор;
- 10%-ный раствор уксуснокислого свинца;
- насыщенный раствор сернокислого натрия;
- 1%-ный титрованный раствор железосинеродистого калия;
- метиленовая синь – $C_{16}H_{18}N_3Cl$ -1%-ный водный раствор;
- йодистый калий, х.ч.;
- сернокислый цинк $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, х.ч.;
- 0,1 н раствор гипосульфита;
- метиловый красный индикатор, серная кислота;
- 20%-ная соляная кислота;
- 0,5% -ный раствор крахмала;
- 0,1 н раствор красной кровяной соли $K_3[Fe(CN)_6]$;
- ;
- 25% раствор йодистого калия KI;
- 9% раствор уксусной кислоты CH_3COOH ;
- 0.3 н раствор HCl;
- 1 %-ный раствор лимоннокислого аммония;
- 0,4 %-ный (1 Н) раствор NaOH;
- 1н раствор CH_3COOH (уксусной кислоты);
- 0,5% и 11,1 %-ный растворы $CaCl_2$, 1%-ный раствор $AgNO_3$ (азотнокислого серебра);
- смесь по объёму (1:10) азотной кислоты (плотность 1,4 г/см³) и 80%-ной уксусной кислоты;
- этиловый эфир и этиловый спирт;
- 0,2 М спиртовой раствор щёлочи ($Ca(OH)_2$ или NaOH)
- весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью не более $\pm 2,00$ мг;
- вакуум-насос механический или водоструйный;
- серебро азотнокислое по ГОСТ 1277, раствор 0,05 моль/дм³, приготовленный на растворе азотной кислоты 1 моль/дм³, х.ч. по ГОСТ 4461;
- индикатор ализарин, спиртовой раствор с массовой долей 0,1%;
- аммиак водный, ч.д.а., по ГОСТ 3760, концентрированный;

- смешанный индикатор (Хинтона)

2. *Определение физико-химических показателей Методика*

определения степени набухания

Одним из основных показателей качества готового продукта в сушильном производстве является его способность к набуханию.

Эта способность может зависеть от вида сырья, его структуры, физикохимических свойств, а также от степени тех изменений, которые произошли в процессе обезвоживания.

Различные методы и режимы сушки водных растений могут вызывать неодинаковую их усадку, при этом в большей или меньшей степени будет изменяться структура материала, а следовательно, и условия для проникновения и связывания влаги внутри кусочка высушенного материала.

Хорошая способность водных растений к набуханию – это результат рационального метода и режима их сушки.

Количественной характеристикой набухания материала является степень набухания Π , Её можно определить гравиметрическим способом: взвешивают образец до и после набухания и рассчитывают

Модифицированная методика определения содержания растворимых и легкогидролизуемых углеводов в воздушно-сухих водных растениях

Метод основан на реакции углеводов с фенолом с образованием комплексного соединения окрашенного в оранжево-жёлтый цвет.

Интенсивность окраски пропорциональна содержанию

углеводов. Реактивы: Серная кислота концентрированная;
фенол (5% водный раствор); глюкоза безводная;

1% раствор серной кислоты; взвешивают 5,6 см³ концентрированной серной кислоты смешивают с дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 1000 мл раствор охлаждают и доводят до метки; осветляющие растворы; 230 г уксуснокислого цинка растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1000 см³, раствор доводят дистиллированной водой до 1000 см³.

150 железистосинеродистого калия растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 см³, раствор доводят дистиллированной водой до 1000 см³.

Приготовление стандартного раствора глюкозы

Глюкозу (или маннозу) отвешивают на аналитических весах 1 г и растворяют дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см³.

Раствор доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Концентрация глюкозы или монозы в стандартном растворе 1 мг/мл

Приготовление рабочих растворов глюкозы

В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают стандартный раствор глюкозы (или маннозы) в количестве 2, 4, 6, 8, 10 мг. Объем каждой пробы доводят водой до метки и тщательно перемешивают. Получают раствор глюкозы (или маннозы) с содержанием 20, 40, 60, 80, 100 мкг/мл.

Проведение испытания

Подготовку проб к испытанию, получение экстрактов растворимых углеводов, получение гидролизатов легкогидролизуемых углеводов и осветление растворов осуществляют в соответствии с требованиями стандарта ГОСТ 26176-84.

Окрашивание растворов и измерение их оптической плотности

Окрашивание осветлённых растворов экстракта и гидролизата, а также рабочих растворов шкалы проводят в термостойких пробирках с притёртыми пробками.

В одну серию пробирок пипеткой вносят по 1 мл приготовленных рабочих растворов глюкозы, в другую по 1 мл осветлённых растворов экстракта в третью осветлённых растворов гидролизата. Затем в каждую пробирку вносят пипеткой по 1 мл 5%-ого водного раствора фенола и для интенсивного перемешивания добавляют по 5 мл концентрированной серной кислоты. Пробирки закрывают притёртыми пробками и интенсивно перемешивают в течение 1-2 мин. После охлаждения до комнатной температуры измеряют оптическую плотность анализируемых растворов пробы и рабочих растворов на фотоэлектроколориметре при длине волны 490 нм в кювете с толщиной пропускания света слоя 20 мм.

Оптическую плотность рабочих растворов шкалы и анализируемых растворов пробы измеряют относительно раствора, содержащего 1 мл воды, 1 мл 5%-ного раствора фенола и 5 мл концентрированной серной кислоты. По показаниям прибора строят градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации глюкозы (или манозы).

Содержание углеводов в исследуемой пробе определяют по градуировочному графику, построенному по результатам измерения оптической плотности рабочих растворов глюкозы.

Массовую долю растворимых углеводов (сахаров) в испытуемой пробе (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = (n \cdot V \cdot V_1 \cdot 100) / (m \cdot V_2 \cdot V_3)$$

где n – количество сахара, определённое по градуировочному графику в экстракте, мг;

V- объём исходного неосветлённого экстракта, см³;

V₁- объём осветлённого экстракта, см³;

V₂ - объём исходного экстракта, взятого на осветление, см³; V₃ -

объём осветлённого экстракта, взятого для окрашивания, см³; m

– масса навески, мг;

100 – коэффициент для пересчёта в проценты;

Массовую долю легкогидролизуемых углеводов (сахаров) в испытуемой пробе (X₁) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = (n \cdot V \cdot V_1 \cdot 100 \cdot 0,9) / (m \cdot V_2 \cdot V_3)$$

где n – количество сахара, определённое по градуировочному графику в гидролизате, мг;

V- объём исходного неосветлённого гидролизата, см³;

V₁- объём осветлённого гидролизата, см³;

V₂ - объём исходного гидролизата, взятого на осветление, см³; V₃ -

объём осветлённого гидролизата, взятого для окрашивания, см³; m

– масса навески, мг;

100 – коэффициент для пересчёта в проценты;

0,9 – коэффициент пересчёта массовой доли растворимых углеводов (сахаров) на массовую долю легкогидролизуемых углеводов (крахмала).

Метод определения сахаров (цианидный).

Метод основан на способности железосинеродистого калия K₃Fe(CN)₆ (красная кровяная соль) в щелочной среде окислять редуцирующие сахара. Реакцию осуществляют путем титрования раствором исследуемого сахара кипящего щелочного раствора железосинеродистого калия в присутствии метиленовой сини в качестве индикатора.

Содержание моносахаров (редуцирующих сахаров) вычисляют по количеству титрованного раствора железосинеродистого калия и объёму израсходованного на его титрование раствора сахара неизвестной концентрации.

Сухую морскую траву измельчают и растирают в ступке. На технических весах в фарфоровую чашку берут навеску влажной травы 10-20 г или сухой массой 5 г исследуемого материала и количественно переносят в широкогорлую мерную колбу вместимостью 250 см³, многократно смывая фарфоровую чашку дистиллированной водой в колбу и доводят объём в колбе с навеской примерно до 150 см³ и перемешают. Если для анализа берут материал, характеризующийся высокой кислотностью, то

содержимое колбы нейтрализуют раствором NaOH по лакмусовой бумаге. Слабокислые вытяжки нейтрализации не подлежат.

Колбу устанавливают на 30 мин на водяную баню при температуре 80° С. Температуру контролируют по термометру, опущенному в колбу с водой. В процессе экстракции углеводов содержимое колбы многократно перемешивают. Затем в колбу добавляют 5 – 10 мл уксуснокислого свинца для осаждения белка. Содержимое колбы перемешивают и избыток уксуснокислого свинца, мешающего в дальнейшем анализе, осаждают насыщенным раствором сернокислого натрия, приливая его при встряхивании колбы небольшими порциями (общий объем 5 – 10 мл) до прекращения образования мути. Затем объем в колбе после охлаждения доводят дистиллированной водой до метки, закрывают пробкой, тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр в коническую или мерную колбу № 1.

В полученном фильтрате определяют редуцирующие (моно) сахара (глюкозу и фруктозу), которые обладают восстанавливающей способностью, т.е. способностью отнимать кислород от других соединений. Фильтратом заполняют бюретку с оттянутым концом, а в коническую колбочку вместимостью 100 – 150 мл наливают из бюретки 20 мл 1 %-ного (титрованного) раствора железосинеродистого калия и пипеткой вливают туда же 5 мл 2,5 н. раствора NaOH.

Колбочку устанавливают на асбестовую сетку над газовой горелкой и, когда содержимое колбы закипит, прибавляют к нему одну каплю раствора метиленовой сини. Не прекращая нагревания, содержимое колбочки титруют раствором сахара из бюретки до обесцвечивания индикатора. Раствор сахара приливают маленькими порциями, постоянно перемешивая содержимое колбочки. Считается, что достоверные результаты получаются при расходовании раствора сахара на титрование в количестве 5 – 6 мл и не более 8 мл. При большем расходовании раствора сахара на титрование уменьшают в 2 раза количество железосинеродистого калия и раствора щелочи.

После остывания оттитрованного раствора может появиться фиолетовая окраска, которая указывает на окисление метиленовой сини кислородом воздуха и в расчет не принимается.

Например, для анализа взяли 20 г растительного материала. Следовательно, 20000 мг растительного материала содержится в 250 см³, а в 1 см³=20000·1/250=80 мг.

Определение содержания сахарозы.

Наряду с моносахаридами – глюкозой и фруктозой в растительном сырье наземного и водного происхождения содержится некоторое количество

дисахаридов – сахарозы. У сахарозы не имеется альдегидных и кетонных групп, и, следовательно, она не обладает восстанавливающей способностью. В связи с этим сахарозу непосредственно нельзя определить этим методом. Ее необходимо расщепить на составные части – глюкозу и фруктозу, и уже в этом состоянии цианидный метод может быть использован.

Из колбы № 1 берут 50 см³ фильтрата и помещают его в мерную колбу на 100 см³. Колбу с фильтратом устанавливают в водяную баню, нагретую до 80° С, и доводят температуру в колбе с исследуемым фильтратом до 80° С. Затем в подогретый испытуемый раствор мерным цилиндром приливают 3 см³ соляной кислоты плотностью 1,19 г/см³ или 5,5 см³ 20%-ной HCl. Содержимое колбы перемешивают и устанавливают на водяную баню, где проводят гидролиз сахарозы в течение 10 мин при температуре 80° С. Затем колбу снимают с бани и охлаждают ее содержимое под холодной водой, добавляют 3 – 4 капли индикатора метилового красного и нейтрализуют насыщенным раствором соды (Na₂CO₃) до перехода красной окраски раствора в золотистую. После раствор в колбе доводят дистиллированной водой до метки, закрывают пробкой и перемешивают. Из этой колбы заполняют бюретку раствором сахара и титруют кипящий раствор железосинеродистого калия, как указано выше.

Содержание моносахаридов после гидролиза вычисляют по формуле (18), как изложено выше. Полученный результат (% инвертированного сахара) умножают на 2 в связи с разбавлением раствора вдвое в процессе инверсии.

Из рассчитанной суммы сахаров (неинвертированный + инвертированный) вычисляют содержание сахарозы по разности между вторым и первым определением.

Метод определения содержания сахаров при помощи красной кровяной соли (йодометрический метод)

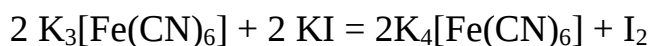
Метод основан на окислении сахаров в щелочной среде железосинеродистым калием (красная кровяная соль). Раствор железосинеродистого калия готовят в воде с добавлением углекислого натрия и тем самым создаётся щелочная среда.

Реакция протекает по схеме:

$K_3[Fe(CN)_6] + \text{сахар} = K_4[Fe(CN)_6] + \text{продукты} + K_3[Fe(CN)_6]$ с избытком окисления сахара остаток Железосинеродистый калий

восстанавливается дожелезистосинеродистого калия (жёлтой кровяной соли), сахар окисляется. В щелочной среде сахара претерпевают ряд химических превращений, получают многочисленные продукты превращения сахаров и их продукты окисления, среди которых находятся гексановые, пентоновые, тетроновые кислоты и ряд других продуктов

окисления. Красная кровяная соль берётся с избытком. Часть красной кровяной соли, вступившая в окислительно-восстановительный процесс с сахаром, восстановится до жёлтой кровяной соли. Остаток красной кровяной соли, не вступивший в реакцию с сахаром, окисляет йодистый калий по схеме:

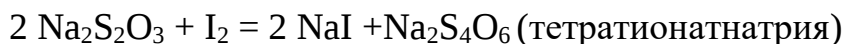


Количество вытесненного йода эквивалентно красной кровяной соли. Чтобы сделать реакцию необратимой, необходимо вывести из реакции вновь образующийся железистосинеродистый калий (жёлтую кровяную соль).

Для этого прибавляется соль цинка, которая образует с красной кровяной солью осадок:



Затем выделившийся йод можно количественно определить, используя метод йодометрического титрования. Йод определяется титрованием 0,1н раствором серноватистокислого натрия (тиосульфита, гипосульфита) в присутствии крахмала-индикатора.



Сущность метода. 1 или 2 г, пробы, содержащей сахар, помещается в коническую колбу на 100 мл, добавляется 18 мл дистиллированной воды и 5 мл 0,1н раствора красной кровяной соли $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Параллельно ставится контрольный опыт (холостая проба), где вместо исследуемого раствора взята дистиллированная вода (20 мл), реактивы приливаются в тех же количествах, что и в рабочей пробе. Рабочая и контрольные пробы помещаются в кипящую водяную баню на 20 минут. По окончании нагревания обе колбы охлаждаются на воздухе. Затем в каждую колбу добавляется 4 мл раствора соли цинка ($\text{ZnSO}_4 + \text{NaCl}$), 1 мл 25%-йодистого калия KI, 5 мл 9% уксусной кислоты CH_3COOH и 1 мл 1% крахмала. Через 1-2 мин. производится титрование выделившегося йода гипосульфитом до исчезновения фиолетовой окраски.

Пример расчёта. Если на контрольный опыт пошло А мл гипосульфита, а на исследуемый (рабочая проба) – В мл, то остаток (избыток) красной кровяной соли, не вошедший в реакцию с сахаром, определяется из соотношения

На реакцию с сахаром расходуется $(5 - X) = Y$ мл красной кровяной соли. По таблице 1 определяется, какое количество сахара в мг соответствует Y - мл красной кровяной соли, затем производим пересчёт в %.

Определение содержания сахара при помощи красной кровяной соли (число мл 0,1 н раствора красной кровяной соли и соответствующее им количество инвертного сахара)

число мл 0,1N K ₂ Fe(CN) ₆	десятичные доли мл и соответств. им мг сахара									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	—	—	—	—	1,35	1,62	1,89	2,16	2,43
1	2,70	2,97	3,24	3,51	3,78	4,05	4,32	4,59	4,86	5,13
2	5,40	5,67	5,94	6,21	6,48	6,75	7,02	7,29	7,56	7,83
3	8,10	8,37	8,64	8,91	9,18	9,45	9,72	9,99	10,26	10,53
4	10,80	11,07	11,34	11,61	11,88	12,15	12,44	12,72	13,00	13,28
5	13,56	13,84	14,12	14,40	14,68	14,96	15,24	15,52	15,80	16,08
6	16,36	16,64	16,92	17,20	17,48	17,76	18,04	18,32	18,60	18,88
7	19,16	19,44	19,72	20,00	20,28	20,56	20,84	21,12	21,40	21,68
8	21,95	22,24	22,52	22,80	23,08	23,36	23,64	23,92	24,20	24,48
9	24,76	25,04	25,32	25,60	25,88	26,16	26,44	26,72	27,00	27,28
10	27,56	27,84	28,12	28,40	28,68	28,95	29,24	29,52	29,80	30,08
11	30,36	30,64	30,92	31,20	31,48	31,76	32,04	32,32	32,60	32,88
12	33,16	33,44	33,72	34,00	34,28	34,56	34,84	35,12	35,40	35,68
13	35,95	36,24	36,52	36,80	37,08	37,36	37,64	37,92	38,20	38,48
14	38,76	39,04	39,32	39,60	39,88	40,16	40,44	40,72	41,00	41,28
15	41,57	41,86	42,15	42,44	42,73	43,02	43,31	43,60	43,89	44,18
16	44,47	44,76	45,05	45,34	45,63	45,92	46,21	46,50	46,79	47,08
17	47,37	47,66	47,95	48,24	48,53	48,82	49,11	49,40	49,69	49,98
18	50,27	50,56	50,85	51,14	51,43	51,72	52,01	52,30	52,59	52,88
19	53,17	53,46	53,75	54,04	54,33	54,62	54,91	55,20	55,49	55,78
20	56,06	56,36	56,65	56,94	57,23	57,52	57,81	58,10	58,39	58,68

Методы количественного определения пектиновых веществ в растительном сырье наземного и водного происхождения

Метод определения гидратопектина и протопектина в растительном сырье наземного и водного происхождения.

Первой операцией при определении массовой доли пектиновых веществ в растительном сырье является извлечение и перевод в растворенное состояние. Для этого берут на весах второго класса точности навеску массой 25 г влажного или 10 г сухого исследуемого материала, тщательно растирают его в ступке до однородной массы. Количественно переносят в коническую колбу на 150 мл, смывая ступку водой, затем добавляют в колбу 100 мл дистиллированной воды температурой 40 °С. Колбу с материалом и водой выдерживают на водяной бане при температуре 40 °С в течение 30 мин. По истечении этого времени содержимое колбы отфильтровывают через

бумажный складчатый фильтр. Операцию повторяют, заливая твердый остаток в колбе 75 мл, а затем ещё раз 50...60 мл воды, отфильтровывая каждый раз жидкость через тот же фильтр. Полученные экстракты собирают в мерную колбу на 250 мл и доводят до метки дистиллированной водой. Полученный раствор гидратопектинов используют для дальнейших анализов.

Для определения массовой доли в растительном сырье протопектина и пектовой кислоты остаток на фильтре измельченного растительного материала заливают 50 мл 0.3 Н раствора соляной кислоты и переносят в коническую колбу на 250 мл, закрывают колбу пробкой с обратным холодильником и выдерживают 30 мин на кипящей водяной бане. По истечении этого времени экстракт отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр в мерную колбу на 500 мл. Остаток на фильтре 3-4 раза промывают 75 мл дистиллированной воды, промывные воды фильтруют через бумажный фильтр в ту же колбу. Фильтр вместе с остатком растительного материала переносят в коническую колбу, заливают от 50 до 70 мл 1 %-ного лимоннокислого аммония и помещают на кипящую водяную баню на 30 мин. Полученный экстракт отфильтровывают через бумажный фильтр в ту же мерную колбу. Фильтр промывают горячей дистиллированной водой, после чего содержимое колбы охлаждают и доводят до метки. Полученные экстракты гидратопектина и протопектина исследуют одним из следующих методов.

Кальций-пектатный метод.

Метод основан на осаждении пектовых кислот в виде кальциевых солей. Это один из наиболее точных методов. Он прост, доступен и имеет хорошую сходимость параллельных анализов. В зависимости от цели исследования можно определить отдельно растворимый пектин, протопектин или сумму пектиновых веществ.

Ход анализа при определении пектинов в обоих растворах одинаков. Отличие в том, что раствор протопектина предварительно нейтрализуют NaOH до прибавления щелочи, необходимой для его гидролиза.

Для гидролиза пектиновых веществ к 50 мл исследуемого раствора прибавляют равный объем 0.4 %-ного (1 Н) раствора NaOH и оставляют на 8.-10 ч при комнатной температуре. По истечении этого времени раствор подкисляют тем же объемом 1 Н уксусной кислоты. Образовавшиеся пектовые кислоты осаждают 50 мл 11,1 %-ного раствора CaCl_2 . Полученный осадок пектата кальция отфильтровывают через заранее высушенный до постоянной массы и взвешенный с бюксом бумажный фильтр. Осадок на фильтре промывают 0,5 %-ным раствором CaCl_2 , затем 5-6 раз холодной дистиллированной водой для удаления ионов хлора (проверка по реакции на

Cl^- с азотнокислым серебром). Для снижения зольности осадок дополнительно промывают 3-4 раза горячей дистиллированной водой. Фильтр с осадком переносят в бюкс и сушат до постоянной массы при температуре 100- 105 °С. Массу осадка, полученную по разности между массой бюкса с осадком на фильтре и массой бюкса с фильтром, умножают на 0.9235 для пересчета на пектовую кислоту. Если масса пектата кальция превышает 0.03 г, опыт необходимо повторить с меньшим количеством экстракта.

Погрешность метода - 0.3 %. Источники ошибок: возможность перехода в осадок пектата кальция непектиновых примесей.

Ускоренный метод определения содержания пектина

Для получения гидролизата навеску 10-15 г влажного или 2-5 г сухого исследуемого материала переносим в колбу добавляем 50 мл HCl (0,3 моль/дм³), нагреваем с обратным холодильником 30 мин. на кипящей водяной бане. После охлаждения гидролизат фильтруем через бумажный фильтр. Во избежание потерь осадок с фильтром промываем 1%-ным раствором лимоннокислого аммония и вновь нагреваем на водяной бане. Собранный фильтрат (колба на 250 мл) охлаждаем, нейтрализуем 10%-ным раствором щёлочи (NaOH) и доводим до метки. Из исходного объёма отбираем 50 мл фильтрата и добавляем столько же 0,4% раствора щёлочи NaOH и оставляем на 18 часов для омыления метоксильных групп. Потом нейтрализуем 50 мл CH_3COOH (1 моль/дм³) и добавляем 50 мл CaCl_2 (2 моль/дм³). Для полноты протекания реакции осаждения раствор отстаивали 1 час. Полученный осадок пектата кальция фильтруем через заранее высушенный до постоянной массы и взвешенный беззольный фильтр. Затем промываем осадок горячей водой. Фильтр с осадком сушим до постоянной массы при температуре 100-105 °С.

Объёмный метод.

Метод основан на осаждении пектовых кислот сильными минеральными кислотами.

К 200 мл исследуемого раствора прибавляют 2.5 мл 40 %-ного раствора гидроокиси натрия и оставляют при комнатной температуре в течение 15 мин. Образовавшуюся пектовую кислоту осаждают 10 мл концентрированной соляной кислоты и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин в градуированной центрифужной пробирке. Пользуясь калибровочной кривой и объемом полученного осадка, определяют концентрацию пектиновых веществ. Для построения калибровочной кривой используют данные табл. 2.

Зависимость концентрации пектиновых веществ от объема осадка

Концентрация пектина, %		Объем осадка пектовой кислоты, мл
Метилловый эфир пектовой кислоты	Полигалактуронаны	
0,05	0,35	11,0
0,10	0,70	21,5
0,15	0,105	30,0
0,20	0,140	34,5
0,25	0,175	39,7
0,30	0,210	44,0

Метод достаточно точен, результаты анализов хорошо воспроизводимы, погрешность определения 0,01%.

Определение содержания клетчатки

Объединённую пробу корнеплодов и клубнеплодов измельчают на пластинки (ломтики) толщиной до 0,8 см. Из объединённой пробы выделяют среднюю пробу, масса которой после высушивания должна быть не менее 100 г. высушивание проб проводят в сушильном шкафу при температуре 60-65 °С до воздушно-сухого состояния. Воздушно-сухую пробу измельчают на мельнице и просеивают через сито диаметром отверстий 1 мм. Трудноизмельчённый остаток на сите после измельчения ножницами или в ступке добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают. Подготовленные пробы хранят в стеклянной или пластмассовой банке с притёртой пробкой в сухом месте и используют для проведения испытания.

Приготовление химических реактивов. Приготовление раствора серной кислоты массовой концентрацией 3%. 17,5 см³ концентрированной серной кислоты переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³, в которую предварительно наливают 200-300 см³ дистиллированной воды, и после охлаждения доводят водой до метки.

Приготовление раствора гидроксида калия массовой концентрации 20%. 200 г гидроксида калия, взвешенной с погрешностью не более 0,1 г, растворяют в 800 см³ дистиллированной воды в фарфоровом стакане.

Приготовление раствора соляной кислоты массовой концентрации 1%. 22 см³ концентрированной соляной кислоты переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят дистиллированной водой до метки.

Проведение испытания по ускоренному варианту. Навеску испытуемой пробы массой около 1 г, взвешенную с точностью до 0,001 г, помещают в стакан вместимостью 300-400 см³. В стакан приливают 100 см³ раствора серной кислоты массовой концентрацией 3%, предварительно нагретого до кипения. Уровень жидкости в стакане отмечают восковым карандашом или

наклеенной полоской бумаги. Содержимое стакана перемешивают стеклянной палочкой и кипятят на плитке в течение 10 мин, читая от начала кипения, при периодическом перемешивании. Кипячение должно быть слабым. Затем стакан снимают с плитки, при помощи стеклянной палочки водой смывают со стенок приставшие частички, следя за тем, чтобы уровень жидкости в стакане дошёл до метки, но не превысил её. Приливают 28 см³ раствора гидроокиси калия массовой концентрации 20%, перемешивают палочкой и вновь кипятят в течение 10 мин. После кипячения осадок отстаивают и раствор фильтруют декантацией через предварительно высушенный при температуре 160 °С в течение 15 мин и взвешенный бумажный фильтр

При использовании для высушивания клетчатки аппарата Чижовой бумажный фильтр должен быть заранее высушен в течение 3 мин при температуре 160 °С и взвешен.

Затем осадок из стакана переносят на фильтр раствором соляной кислоты массовой концентрации 1%, и на фильтре промывают этим же раствором два раза по 20 см³. Затем фильтр и клетчатку промывают до нейтральной реакции (3-4 раза) горячей водой и приметно 20 см³ спирта и 20 см³ диэтилового эфира. Фильтрование лучше проводить под вакуумом, создаваемым вакуумным насосом. При этом фильтр помещают на воронку Бюхнера, вставленную через резиновую пробку в колбу Бюнзена. Диаметр фильтра должен быть на 2-3 см больше диаметра воронки Бюхнера. Фильтр с промытой клетчаткой высушивают в сушильном шкафу при температуре 160 °С в течение 2 ч для проб с содержанием сырой клетчатки более 15% и в течение 1,5 ч для проб с содержанием сырой клетчатки менее 15%. Затем охлаждают в эксикаторе и взвешивают на лабораторных весах 2-ого класса точности. Допускается высушивать осадок с фильтром при температуре 105 °С в течение 4 ч.

Допускается сырую клетчатку высушивать в аппарате Чижовой. Для этого фильтр с клетчаткой из воронки Бюхнера берут пинцетом, складывают вчетверо, загибая края вовнутрь, и помещая в прибор Чижовой, предварительно нагретый до температуры 160 °С, высушивают в течение 5 мин. Высушенный фильтр с клетчаткой охлаждают в течение 5 мин в эксикаторе и взвешивают.

За результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Результаты вычисляют до второго десятичного знака и округляют до первого десятичного знака. Допускаемые расхождения между результатами двух параллельных определений (d_{abc}) и между двумя результатами, полученными в разных условиях (D_{abc}) при доверительной вероятности $P=0,95$

Определение клетчатки (по Кюшнеру и Ганаку).

Метод определения целлюлозы основан на окислении, разрушении и растворении различных химических соединений, входящих в состав пищевого сырья или пищевого продукта, смесью уксусной и азотной кислот. При этом целлюлоза практически не растворяется, отфильтровывается и взвешивается.

Методика проведения анализа. Берут навеску образца 1 г на аналитических весах, помещают в колбу на 100 см³, приливают 40 см³ смеси кислот, закрывают колбу обратным холодильником и нагревают на песчаной бане в течение 1 часа. Затем отфильтровывают белый, слегка кремовый осадок через стеклянный тигель №2 или тигель Гуча с асбестовым фильтром. Если осадок после фильтрования экстракта имеет кремовый цвет, то его промывают 1-2 раза горячей 0,2 М спиртовой щёлочью, затем несколько раз небольшими порциями дистиллированной воды и под конец - 10 см³ спирта с эфиром. При этом следят, чтобы растворители хорошо отмыли стенки тиглей (при анализе масляных культур на них может оставаться маслянистая жидкость). Тигли с чисто-белым осадком высушивают до постоянной массы при температуре 105 °С в сушильном шкафу.

При анализе овощных растений навески сухого материала увеличивают до 1,5 г, заливают 50 см³ смеси кислот и также нагревают в течение 1 часа.

Методика получения полисахаридов зостерина и его солей.

Воздушно-сухую траву в количестве 10-50 г загрузить в перфорированной металлической сетке в емкость для замачивания, залить водой в соотношении 1:10, оставить на 30 мин, после чего слить воду и промыть. Промытую траву поместить в стакан (объемом 500 мл) и залить этиловым спиртом концентрации 96 % в соотношении 1:1, нагреть до температуры 70 °С, заданную температуру поддерживать в течение 3,5 ч и полученный первый экстракт отделить от травы. Такую обработку провести второй раз, слить образовавшийся экстракт и отделить траву прессованием. Подготовленную траву направить на деминерализацию для чего поместить её в стеклянную ёмкость объемом 1 л, залить 3 %-ным раствором соляной кислоты температурой 70°С в соотношении 1:10, используя перемешивание и выдержать при температуре 70 °С в течение 3 часов при периодическом перемешивании. Кислый экстракт слить, оставшуюся траву промывать многократно до нейтральной реакции (рН = 67). Промывные воды собирать в емкость с кислым раствором, который после нейтрализации направить в канализацию. Промытую траву отжать, взвесить и направить на трёхстадийную экстракцию 1 %-ным раствором щавелевокислого аммония в соотношении 1:6 при температуре 50 °С в течение 8 часов (1-я стадия). После

проведения экстракции раствор слить в емкость для сбора, а оставшуюся траву залить новым экстрагентом. Осуществить аналогично 2-ю, 3-ю стадии экстракции при тех же параметрах. В отдельную ёмкость собрать экстракты с трех стадий обработки, травяной остаток после 3-й экстракции отжать. Измерить объем объединенного экстракта и разделить на три равные части.

В первую часть экстракта для осаждения зостерина вводить 10 %-ный раствор соляной кислоты в количестве 10-15 % к массе обрабатываемого объема экстракта при постоянном перемешивании в течение 5-10 мин.

Во вторую часть экстракта добавить 10 % раствор углекислого натрия в соотношении 2:1 при постоянном перемешивании в течение 10-20 мин для получения зостерата натрия.

В третью часть экстракта добавить 96 %-ный этиловый спирт в соотношении 1 : 0,8 при постоянном перемешивании в течение 10 мин для получения зостерата аммония.

Полученные экстракты с осажденными зостерином, зостератом натрия, зостератом аммония центрифугировать при 3000 об/мин в течение 20 мин. Плотную часть направить на дальнейшую промывку. Полученные после центрифугирования плотные части зостерина, зостерата натрия, зостерат аммония залить водой питьевой в соотношении 1:1 при перемешивании в течение 5 мин. и направить на центрифугирование при 3000 об/мин в течение 20 мин. для отделения хлопьевидных и гелеобразных осадков. Зостерин, зостерат натрия, зостерат аммония направить на сушку в тонком слое толщиной 0,4 см в сушильном шкафу с циркуляцией воздуха при температуре 45 °С в течение 15-16 ч. до достижения равновесной влажности 12-13 %.

Определение содержания сухих веществ. Содержание сухих веществ в экстрактах полисахаридов определяют на рефрактометре типа УРЛ №751659.

Методы исследования показателей качества полисахаридов из водных растений.

Отбор проб для определения органолептических и физико-химических показателей качества пектиновых веществ осуществляется по ГОСТ 2916.

Метод определения органолептических показателей.

Сущность метода состоит в органолептической оценке внешнего вида, вкуса, запаха и цвета. Для определения органолептических показателей пектина часть пробы продукта помещают на лист белой бумаги и при рассеянном дневном свете или люминесцентном освещении визуально устанавливают форму частиц, а затем последовательно определяют цвет, запах и вкус на соответствие их требованиям стандарта. Посторонние примеси, видимые невооруженным глазом, определяют визуально.

Метод определения влаги.

В предварительно высушенную до постоянной массы и взвешенную с точностью до 0,001 г бюксу (m_1) с песком и стеклянной палочкой отбирают $1,5 \div 2$ г измельченного мяса (в случае определения массовой доли жира в высушенной пробе отбирают 5 г), навеску при помощи стеклянной палочки равномерно тонким слоем распределяют по дну бюксы, затем бюксу взвешивают (m_2). Бюксу с пробой помещают в сушильный шкаф и высушивают при температуре $100 \div 105$ °С до постоянной массы. Первое взвешивание проводят через 3 часа после начала сушки, последующие — через $30 \div 40$ минут.

Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя взвешиваниями не превышает 0,0001 г.

Перед каждым взвешиванием бюксу с пробой помещают в эксикатор и охлаждают в течение 30 минут.

Бюксу с высушенной пробой охлаждают в эксикаторе и затем взвешивают (m_3). Массовую долю воды вычисляют по формуле 17 (в %):

$$X_B = \frac{(m_2 - m_3) \cdot 100}{(m_2 - m_1)} \quad (17)$$

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,5 %.

Вычисление проводят до первого десятичного знака.

Определение степени этерификации пектина.

Полноту этерификации полигалактуроновых кислот можно количественно охарактеризовать степенью этерификации или метилирования (процентное содержание этерифицированных карбоксильных групп от их общего числа), а также метоксильной составляющей (процент метоксиэфирных групп от общей массы полигалактуроновой кислоты). Метоксильная составляющая полностью этерифицированной полигалактуроновой кислоты (при степени этерификации 100 %) равна 16,32 %. Максимальное значение метоксильной составляющей пектинов, выделенных из естественных источников, не превышает 13,5 %.

Метод основан на титриметрическом определении свободных и, после омыления, этерифицированных карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в очищенной от растворимых балластных примесей и катионов навеске препарата пектина.

Подготовка к испытанию. В сухом фильтрующем тигле взвешивают около 0,500 г пектина и заливают его таким количеством спирта, подкисленного соляной кислотой, чтобы получить редкую кашу. Тигель

присоединяют к колбе с тубусом с помощью мягкой резиновой пластины с отверстием. Колбу соединяют с источником разрежения. Пектин промывают той же спиртовой смесью (по 20 см³), перемешивая палочкой и периодически отсасывая фильтрат, до отрицательной реакции на ион алюминия с раствором ализарина. Для качественного определения алюминия каплю фильтрата помещают на фильтровальную бумагу и обрабатывают ее парами аммиака над бюксой с концентрированным раствором аммиака. Образовавшееся водянистое пятно смачивают спиртовым раствором ализарина и снова обрабатывают парами аммиака. В присутствии ионов алюминия появляется красноватое пятно алюминиевого лака. Более отчетливо красный цвет виден при подсушивании бумаги. Затем пектин промывают 75%-ным спиртом (по 20 см³) до отрицательной реакции на ион хлора (к нескольким каплям фильтрата на часовом стекле прибавляют раствор азотнокислого серебра). Промывку считают законченной по прекращении выделения белой мути хлористого серебра. После этого промывают три раза (по 20 см³) 96%-ным спиртом.

Проведение испытания. Промытую пробу количественно переносят в коническую колбу, смывают остатки ее из тигля дистиллированной водой, нагретой до 40 °С, доводя общий ее объем примерно до 100 см³. Колбу плотно закрывают и тщательно взбалтывают содержимое до полного растворения пектина. Пробу титруют раствором гидроксида натрия в присутствии шести капель смешанного индикатора до розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Учитывают объем израсходованного раствора гидроксида натрия (V₁). Затем приливают 50 см³ того же раствора гидроксида натрия, плотно закрывают колбу и оставляют на 1 ч для омыления этерифицированных карбоксильных групп. После этого к раствору прибавляют пипеткой 50 см³ раствора соляной кислоты, а ее избыток вновь оттитровывают раствором гидроксида натрия (V₂).

Степень этерификации (Э) в процентах вычисляют по формуле:

$$\text{Э} = \frac{V_2}{V_1 + V_2} \cdot 100 ,$$

где V₁ - объем раствора гидроксида натрия 0,1 моль/дм³, используемого на первое титрование, см³;

V₂- объем раствора гидроксида натрия 0,1 моль/дм³, используемого на второе титрование, см³.

За результат испытаний принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, допускаемое абсолютное расхождение между которыми не должно превышать 1% (доверительная вероятность 0,95)

Определение кинематической вязкости

Кинематическую вязкость экстрактов или 1% раствора зостерата натрия измеряют на вискозиметре типа ВПЖ-2 ($d=1,47$) по методике, изложенной в лабораторной работе № 4.

Определение кинематической вязкости и средневязкостной молекулярной массы (Мм).

Определение кинематической вязкости проводят инструментальным методом с помощью вискозиметра Оствальда капиллярного стеклянного ВПЖ-4 (диаметр 0,82 см). При этом зостерат натрия растворяют в 0,1 н растворе NaOH.

Для определения средней молярной массы пектина готовят серию растворов с различной концентрацией пектина и по времени истечения рассчитывались относительная, удельная, приведенная вязкости (см. методику определения молекулярной массы хитозана в лабораторной работе № 4). Далее находится характеристическая вязкость – исходя из графической зависимости приведенной вязкости от концентрации исследуемых растворов и экстраполяции на нулевую концентрацию. Отрезок, отсекаемый при этом от оси ординат, равен вискозиметрической вязкости пектина.

Для расчета молярной массы пектина использовалось уравнение Марка – Хаувинка – Куна (формула):

$$[\eta] = K \cdot M^{\alpha},$$

где $[\eta]$ – характеристическая вязкость пектина; M – средняя молярная масса пектина, г/моль; K, α – константы ($K = 1,1 \cdot 10^{-5}$, $\alpha = 1,22$) по методике логарифмирования (Донченко, 2000).

Также рассчитывается вискозиметрическая константа Хаггинса. Константа Хаггинса находилась, как тангенс угла наклона прямой $\eta_{уд}/C_{п} = f(C_{п})$ к квадрату характеристической вязкости

Коэффициент Хаггинса служит характеристикой «сродства» полимера с растворителем, так как он характеризует взаимодействие молекул полимера в системе полимер-растворитель.

Чем больше величина константы Хаггинса, тем, в термодинамическом смысле, хуже для него растворитель. При малой величине константы Хаггинса вероятность сцепления молекул и образования ассоциатов в растворе снижается, растворитель в этом случае является более «хорошим» с термодинамической точки зрения.

Методика определения комплексообразующей способности зостерина и зостерата натрия

Определение студнеобразующей способности пектина осуществляют в соответствии с ГОСТ 29186-91 «Пектин. Технические условия».

Комплексообразующую способность пектиновых веществ определяют по методике, разработанной на кафедре неорганической химии Пятигорского фармацевтического института (Карпович, 1989). Суть методики заключается в том, что определенное количество пектинового экстракта обрабатывают стандартным раствором свинца. Выпадающие Pb-пектаты после мокрого сжигания анализируют на количество поглощенного свинца трилонометрически.

Подготовка пробы к испытанию. Получение экстракта. Навеску зостерина массой 0,5г растворяют в 0,1н. растворе NaOH. Полученный раствор фильтруют под вакуумом и нейтрализуют 1н. раствором CH₃COOH. Нейтрализованную пробу используют для анализа.

Проведение испытания. Получение Pb-пектатов. 25 мл стандартного раствора свинца (N = 0,035) разбавляют 50 мл дистиллированной воды и доливают 25 мл исследуемого пектинового экстракта. Образующийся объемный осадок Pb-пектатов фильтруют через бумажный фильтр (красная лента) на большой воронке. Осадок многократно промывают дистиллированной водой до исчезновения Pb²⁺-иона в промывных водах (проба с Na₂S). Далее осадок промывают 50-100 мл 96%-ного этилового спирта. Затем отделяют осадок от фильтра, слегка подсушивают на воздухе и количественно переносят в колбу Кьельдаля (емкостью 100 мл) для мокрого сжигания.

Мокрое сжигание Pb-пектатов. В качестве сжигающегося агента используют смесь концентрированной азотной кислоты (х. ч.) и 30%-ного раствора пероксида водорода в соотношении 3 : 1. В колбу Кьельдаля с осадком Pb-пектатов доливают 30-40 мл указанной выше смеси и сжигают осадок кипячением содержимого колбы, нагревая ее пламенем горелки. Сжигание проводят в течение 30-40 мин до достижения полной прозрачности раствора.

При сжигании на дне колбы появляется кристаллический осадок. Содержимое колбы Кьельдаля после сжигания Pb-пектатов количественно переносят в мерную колбу на 50 мл, используя дистиллированную воду для смывов и доведения объема до метки. Полученный свинец, содержащий раствор, анализируют трилонометрически, как описано ниже.

Трилонометрическое определение свинца. Для определения свинца трилоном Б используется метод обратного титрования аликвоты свинца стандартным раствором сульфата цинка. К аликвоте свинца предварительно

доливают избыточное количество стандартного раствора трилона Б. Стандартный раствор сульфата цинка готовят растворением соответствующей навески соли $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в дистиллированной воде из расчета 0,05 н. концентрации. Титр раствора сульфата цинка устанавливают по 0,05 н. раствору трилона Б, приготовленного из фиксанала.

Нормальность анализируемого раствора свинца устанавливают следующим образом: отбирают пипеткой в титровальную колбу вместимостью 10-20 мл свинецсодержащего раствора, доливают 10-20 мл 0,05 н. раствора трилона Б, 15 мл аммиачного буфера и 1 мл индикатора эриохрома черного Т. Далее титруют стандартным раствором сульфата цинка до перехода окраски индикатора от синей к сиреневой.

3. Результаты исследования

Характеристику показателей качества объекта исследования морской травы zostеры или пресноводных растений семейства рдестовых следует оформлять по форме таблицы 3.

Таблица 3

Характеристика органолептических и физико-химических показателей качества объекта исследования

Наименование показателя	Характеристика показателей качества	
	по требованию стандарта	исследуемый образец
Внешний вид		
Цвет		
Запах		
Размер пластинок или стеблей водных растений		
Степень набухания, %		
Содержание, %		
- воды		
- белка		
- клетчатки		
- золы		
- жира		
- растворимых углеводов		
- легкогидролизуемых углеводов		
- пектина, пентозанов		

Показатели качества полисахаридов zostерина, рдестина и их солей оформляются по форме табл.4.

Органолептические и физико-химические показатели качества полисахаридов

Наименование показателя	По требованиям стандарта ГОСТ 29186-91 «Пектин»	Исследуемый образец
Внешний вид		
Вкус		
Запах		
Цвет		
Массовая доля влаги, %, не более		
Массовая доля золы, %, не более		
Кинематическая вязкость, 1% раствора полисахарида		
Степень этерификации, %		
Студнеобразующая способность, градусы Тарр-Бейкера, не менее		
Комплексообразующая способность, мг Pb ²⁺ /мл		

На основании данных таблиц делают выводы.

4. Вопросы для самоконтроля

1. Характеристика водного растения морской травы zostеры каспийской малой: строение, химический состав;
2. Характеристика пресноводного растения семейства рдестовых: строение, химический состав;
3. Что характеризует степень набухания высушенных водных растений;
4. Способы получения полисахаридов из водных растений;
5. Практическое применение полисахаридов, полученных из водных растений;
6. Органолептическая характеристика полисахаридов из водных и наземных растений;
7. Что показывает степень этерификации (СЭ) пектиновых веществ, особенности метода определения данного показателя;
8. Комплексообразующая способность пектиновых веществ;
9. Студнеобразующая способность пектиновых веществ и влияние на неё степени этерификации (низкоэтерифицированные и высокоэтерифицированные пектиновые вещества);
10. Определение видов вязкостей растворов полисахаридов и вискозиметрической константы Хаггинса.

11. Сущность метода определения молекулярной массы (Мм) полисахаридов.

Рекомендуемые источники представлены рабочей программе дисциплины