

**VIOLETA NOUR**



**VIOLETA NOUR**

# **SIGURANȚA ALIMENTARĂ**

**ÎNDRUMĂTOR DE LUCRĂRI  
DE LABORATOR**



**EDITURA UNIVERSITARIA  
Craiova, 2023**

**Referenți științifici:**

**Conf.univ.dr. Camelia MUNTEAN**

**Conf.univ.dr. Mira Elena IONICĂ**

Copyright © 2023 Editura Universitaria

Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universitaria

**Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României**

**NOUR, VIOLETA**

**Siguranța alimentară : îndrumător de lucrări de laborator /**

Violeta Nour. - Craiova : Universitaria, 2023

Conține bibliografie

ISBN 978-606-14-1931-9

613

© 2023 by Editura Universitaria

Această carte este protejată prin copyright. Reproducerea integrală sau parțială, multiplicarea prin orice mijloace și sub orice formă, cum ar fi xeroxarea, scanarea, transpunerea în format electronic sau audio, punerea la dispoziția publică, inclusiv prin internet sau prin rețelele de calculatoare, stocarea permanentă sau temporară pe dispozitive sau sisteme cu posibilitatea recuperării informațiilor, cu scop comercial sau gratuit, precum și alte fapte similare săvârșite fără permisiunea scrisă a deținătorului copyrightului reprezintă o încălcare a legislației cu privire la protecția proprietății intelectuale și se pedepsesc penal și/sau civil în conformitate cu legile în vigoare.

## SPECTROSCOPIA DE ABSORBȚIE ÎN UV-VIS

Spectroscopia de absorbție moleculară UV-Vis este o tehnică analitică care măsoară cantitatea de radiație, având lungimi de undă distincte ultraviolete sau vizibile, care este absorbită de o probă, sau transmisă printr-o probă, în comparație cu o probă de referință sau martor. Această proprietate este influențată de compoziția eșantionului, putând oferi informații despre ce se află în eșantion și la ce concentrație. Deoarece această tehnică de spectroscopie se bazează pe utilizarea luminii, să luăm în considerare mai întâi proprietățile luminii.

Lumina are o anumită cantitate de energie care este invers proporțională cu lungimea de undă. Astfel, lungimile de undă mai scurte ale luminii transportă mai multă energie, iar lungimile de undă mai lungi transportă mai puțină energie. Când lumina incidentă lovește materia, aceasta poate fi absorbită, reflectată, sau transmisă. Absorbanța radiației în intervalul UV-Vis provoacă excitație atomică, care se referă la tranziția moleculelor de la o stare fundamentală cu energie scăzută la o stare excitată. Înainte ca un atom să poată schimba stările de excitație, trebuie să absoarbă niveluri suficiente de radiație pentru ca electronii să se deplaseze pe orbite moleculare superioare. Este necesară o anumită cantitate de energie pentru a promova electronii dintr-o substanță la o stare de energie mai mare pe care să o putem detecta ca absorbție. Electronii din medii diferite de legare într-o substanță necesită o cantitate specifică diferită de energie pentru a promova la o stare de energie mai mare. Acesta este motivul pentru care absorbția luminii are loc pentru diferite lungimi de undă în diferite substanțe.

Oamenii sunt capabili să vadă un spectru de lumină vizibilă, de la aproximativ 380 nm, pe care o vedem ca violet, până la 780 nm, pe care o vedem ca roșu. Lumina UV are lungimi de undă mai scurte decât cele ale luminii vizibile, de până la aproximativ 100 nm. Prin urmare, lumina poate fi descrisă prin lungimea de undă, ceea ce poate fi util în spectroscopia UV-Vis pentru a analiza sau identifica diferite substanțe prin localizarea lungimilor

de undă specifice corespunzătoare absorbanței maxime. În figura 1.1 sunt prezentate principalele componente ale unui spectrofotometru UV-Vis.

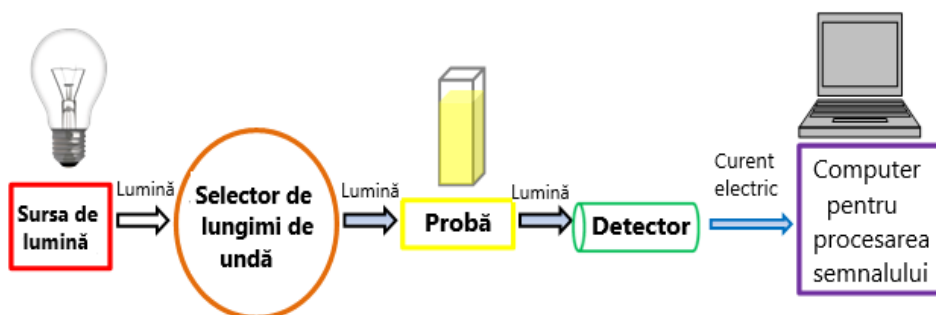


Figura 1.1. Schema simplificată a componentelor principale ale unui spectrofotometru UV-Vis (după Justin, 2021).

### 1.1. Sursa de lumină

Fiind o tehnică bazată pe lumină, este esențial să aibă o sursă constantă, capabilă să emită lumină pe o gamă largă de lungimi de undă. O singură lampă cu xenon este folosită în mod obișnuit ca sursă de lumină de înaltă intensitate atât pentru raze UV, cât și pentru cele vizibile. Lămpile cu xenon sunt, totuși, asociate cu costuri mai mari și sunt mai puțin stabile în comparație cu lămpile cu tungsten și cu halogen. Pentru instrumentele care folosesc două lămpi, o lampă cu tungsten sau cu halogen este utilizată în mod obișnuit pentru lumina vizibilă, în timp ce o lampă cu deuteriu este sursa comună de lumină UV. Întrucât sunt necesare două surse de lumină diferite pentru a scana atât lungimile de undă UV, cât și cele vizibile, sursa de lumină din aparat trebuie să se schimbe în timpul măsurării. În practică, această comutare are loc în mod obișnuit în timpul scanării între 300 și 350 nm, unde emisia de lumină este similară de la ambele surse de lumină și tranziția se poate face mai ușor.

### 1.2. Selectarea lungimii de undă

În pasul următor, anumite lungimi de undă de lumină potrivite tipului de eșantion și analizorului pentru detectare trebuie selectate pentru examinarea probei dintre lungimile de undă largi emise de sursa de lumină.

---

Pentru aceasta se pot folosi monocromatoare, filtre de absorbție, filtre de interferență, filtre de decuplare, filtre de trecere a benzii. Monocromatoarele sunt utilizate cel mai frecvent pentru acest proces datorită versatilității lor. Cu toate acestea, filtrele sunt adesea folosite împreună cu monocromatoarele pentru a îngusta lungimile de undă ale luminii selectate pentru măsurători mai precise și pentru a îmbunătăți raportul semnal-zgomot.

### **1.3. Analiza probei**

Indiferent de selectorul de lungime de undă utilizat în spectrofotometru, lumina trece apoi printr-o probă. Pentru toate analizele, este absolut necesară măsurarea unei probe de referință, denumită adesea „probă martor”, cum ar fi o cuvă umplută cu un solvent similar utilizat pentru prepararea probei. Dacă pentru măsurători se folosește o soluție apoasă tamponată care conține proba, atunci soluția apoasă tamponată fără substanța de interes este utilizată ca referință. La examinarea culturilor bacteriene, mediile de cultură sterile vor fi folosite ca referință. Semnalul probei de referință este apoi utilizat automat de instrument pentru a ajuta la obținerea valorilor reale de absorbție ale analiților.

O atenție deosebită trebuie acordată materialelor și condițiilor utilizate în experimentele de spectroscopie UV-Vis. De exemplu, majoritatea cuvelor din plastic sunt inadecvate pentru studiile de absorbție UV, deoarece plasticul absoarbe în general lumina UV. Sticla poate acționa ca un filtru, absorbind adesea majoritatea UVC (100-280 nm) și UVB (280-315 nm), dar permițând trecerea unor UVA (315-400 nm). Prin urmare, sunt necesare cuve de cuarț pentru examinarea UV, deoarece cuarțul este transparent pentru majoritatea luminii UV. Aerul poate fi considerat și ca un filtru, deoarece lungimile de undă ale luminii mai scurte de aproximativ 200 nm sunt absorbite de oxigenul molecular din aer. Este necesară o configurație specială și mai costisitoare pentru măsurătorile cu lungimi de undă mai mici de 200 nm, implicând de obicei un sistem optic umplut cu argon pur. Sunt disponibile, de asemenea, sisteme fără cuve care permit analiza unor volume foarte mici de probă, de exemplu în analizele ADN sau ARN.

---

#### **1.4. Detecția**

După ce lumina a trecut prin eșantion, se folosește un detector pentru a transforma lumina într-un semnal electronic care poate fi citit. În general, detectoarele se bazează pe acoperiri fotoelectrice sau semiconductori.

O acoperire fotoelectrică emite electroni încărcăți negativ atunci când este expusă la lumină. Când electronii sunt emiși, se generează un curent electric proporțional cu intensitatea luminii. Un tub fotomultiplicator (PMT) este unul dintre cei mai frecvenți detectori utilizați în spectroscopia UV-Vis. Un PMT se bazează pe efectul fotoelectric de a emite inițial electroni la expunerea la lumină, urmată de multiplicarea secvențială a electronilor emiși care generează un curent electric mai mare. Detectorii PMT sunt utili în special pentru detectarea nivelurilor foarte scăzute de lumină.

Când semiconductorii sunt expuși la lumină, aceștia vor fi străbătuți de un curent electric proporțional cu intensitatea luminii. Mai precis, fotodiodele și dispozitivele cuplate de încărcare (charge-coupled device-CCD) sunt doi dintre cei mai obișnuiți detectori bazați pe tehnologia semiconductoare.

După ce curentul electric este generat de la orice detector utilizat, semnalul este apoi recunoscut și transmis către un computer sau un ecran.

#### **1.5. Analiză spectroscopică UV-Vis, spectru de absorbție și unități de absorbanță**

Informațiile din spectroscopia UV-Vis pot fi prezentate sub forma unui grafic al absorbanței, densității optice sau transmitanței în funcție de lungimea de undă. Cu toate acestea, informațiile sunt prezentate mai des ca un grafic al absorbanței pe axa verticală  $Oy$  și al lungimii de undă pe axa  $Ox$  orizontală. Acest grafic este de obicei denumit spectru de absorbție și un exemplu este prezentat în figura 1.2.



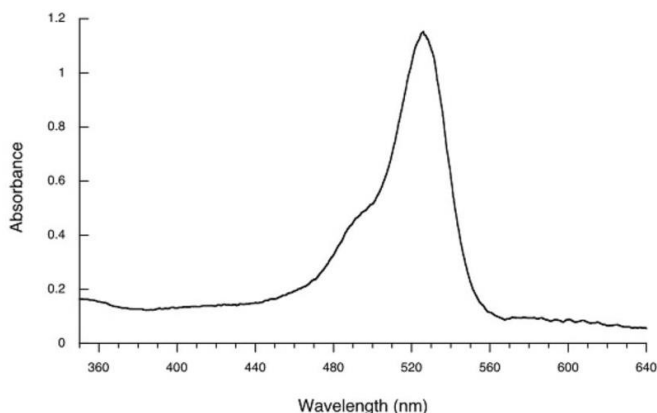


Figura 1.2. Exemplu de spectru de absorbție dat de un spectrofotometru UV-Vis.

Pe baza celor prezentate, se poate aștepta în mod rezonabil ca intensitatea luminii să fie legată cantitativ de cantitatea de lumină absorbită de probă.

Legea Lambert - Beer reprezintă legea de bază folosită în analizele sau determinările spectrofotometrice. Ea este utilizată în special pentru obținerea concentrației unei substanțe dacă există o relație liniară folosind un set măsurat de soluții standard care conțin aceeași substanță.

În condițiile în care considerăm o radiație incidentă monocromatică,  $I_0$ , care cade pe o celulă conținând proba, după trecerea prin probă se înregistrează intensitatea finală,  $I$ , care este mai mică decât cea inițială,  $I_0$ , în urma absorbției luminii la trecerea prin celulă (Figura 1.3). Celula are lungimea  $l$  iar concentrația substanței ce absoarbe lumina,  $C$ .

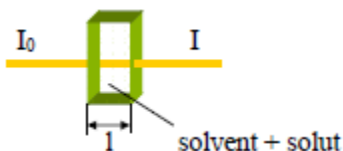


Figura 1.3. Absorbția luminii în cazul legii Lambert-Beer (după Nașcu și Jäntschi, 2006).

Dacă lungimea  $l$  provoacă o reducere cu un anumit procent a intensității inițiale,  $I_0$ , de exemplu cu 50%, un nou strat de lungime  $l$ , egal cu primul, va acționa, conform legii Lambert- Beer, în același mod, adică va diminua tot la jumătate noua radiație incidentă. În figura 1.4 se observă că graficul punctelor corespunzătoare dimensiunilor celulei  $1l$ ,  $2l$ ,  $3l$ , ... se distribuie pe o curbă exponențială. Această curbă poate fi scrisă algebric ca o funcție:

$$I = I_0 \cdot e^{-kl} \quad (1)$$

unde  $k$  este o constantă. Această ecuație reprezintă una din formele legii lui Lambert - Beer. Raportul dintre  $I$  și  $I_0$  poartă numele de transmitanță ( $T=I/I_0$ ), și exprimă cât de multă lumină a trecut printr-o probă.

Legea Lambert - Beer mai poate fi scrisă și sub forma:

$$\ln(I/I_0) = -kl \quad (2)$$

sau schimbând semnul

$$\ln(I_0/I) = kl \quad (3)$$

Absorbanța ( $A$ ) este egală cu logaritmul fracției dintre intensitatea luminii înainte de trecerea prin eșantion ( $I_0$ ) împărțită la intensitatea luminii după trecerea prin eșantion ( $I$ ).

$$A = \ln(I_0/I) = -\ln(T) \quad (4)$$

Introducând absorbanța ( $A$ ) în ecuația precedentă, legea Lambert-Beer mai poate fi scrisă sub forma:

$$A = kl \quad (5)$$

unde  $A$  este absorbanța,  $k$  - coeficientul de absorbție iar  $l$  - lungimea parcursă de lumină prin mediul care absoarbe sau lungimea celulei.

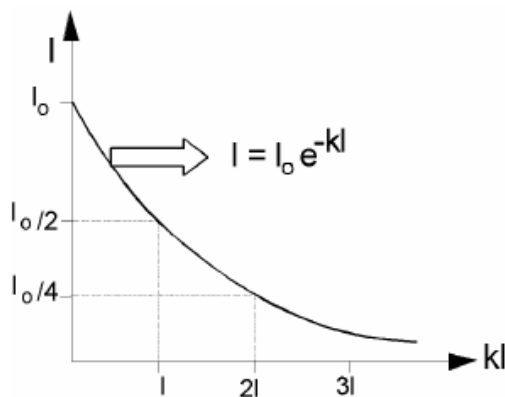


Figura 1.4. Forma exponențială a legii Lambert-Beer (după Nașcu și Jăntschi, 2006).

---

Coeficientul de absorbție,  $k$ , s-a găsit că este proporțional cu concentrația substanței care absoarbe lumina,  $C$  adică  $k = \text{const.} \cdot C$ . În funcție de diversele moduri de exprimare ale concentrației, constanta  $k$  are valori diferite. În cazul exprimării concentrației în mol/L, această constantă se numește *coeficient molar de extincție* (sau de absorbanță), simbolizată  $\epsilon$ .

În consecință, forma cea mai utilizată dar și cea mai simplă a legii Lambert - Beer este:

$$A = \epsilon l C \quad (6)$$

Din examinarea acestei ecuații se poate observa că dacă  $l = 1 \text{ cm}$  și  $C = 1 \text{ mol/L}$ , atunci avem  $\epsilon = A$ . Așadar, coeficientul molar de extincție reprezintă absorbanța unei soluții de concentrație 1 mol/L dacă lungimea celulei cu probă este 1 cm. Legea este riguros respectată doar pentru o radiație monocromatică. Deci, cu cât filtrul optic este mai îngust, ca domeniu spectral, cu atât liniaritatea dreptei se respectă pe un domeniu mai larg de concentrații. Dar un filtru cu domeniu spectral îngust lasă să treacă puțină lumină și performanțele metodei sunt condiționate și de performanțele detectorului.

Legea lui Lambert-Beer este adesea aplicată pentru a obține concentrația probei ( $C$ ) după măsurarea absorbanței ( $A$ ) atunci când absorbivitatea molară ( $\epsilon$ ) și lungimea traseului ( $l$ ) sunt cunoscute. De obicei,  $\epsilon$  este exprimat cu L/mol·cm,  $l$  se exprimă în cm, iar  $C$  este exprimată în mol/L. În consecință,  $A$  nu are unități.

Cunoașterea condițiilor experimentale în timpul măsurărilor este importantă. Cuvele proiectate pentru o lungime a drumului optic de 1 cm sunt standard și sunt cele mai comune. Uneori, este disponibilă foarte puțină probă pentru examinare și este necesar un drum optic mai scurt de 1 mm.

Acolo unde este necesară cuantificarea, valorile absorbanței trebuie menținute sub 1, în intervalul dinamic al instrumentului. Acest lucru se datorează faptului că o absorbanță de 1 implică faptul că eșantionul a absorbit 90% din lumina de intrare sau, în mod echivalent, 10% din lumina de intrare a fost transmisă prin eșantion. Cu atât de puțină lumină care ajunge la detector, unele spectrofotometre UV-Vis nu sunt suficient de sensibile pentru a cuantifica cantități mici de lumină în mod fiabil. Două soluții simple posibile la această problemă sunt fie diluarea probei, fie reducerea lungimii drumului optic.

---

După cum s-a menționat mai sus, înregistrarea unui spectru de bază folosind o soluție de referință „blank” este esențială. Dacă instrumentul ar fi absolut perfect din toate punctele de vedere, linia de bază ar avea absorbanta zero pentru fiecare lungime de undă examinată. Într-o situație reală, totuși, spectrul de bază va avea de obicei niște valori de absorbanta pozitive și negative foarte mici. Pentru cele mai bune practici, aceste valori mici de absorbanta sunt adesea scăzute automat din valorile de absorbanta ale eșantionului pentru fiecare lungime de undă a luminii de către software pentru a obține valorile adevărate de absorbție.

În funcție de scopul analizei, construirea unei curbe de calibrare poate fi de dorit. Construirea unei curbe de calibrare este foarte utilă pentru a determina concentrația unei anumite substanțe într-o probă pe baza măsurătorilor de absorbție.

În spectroscopia UV-Vis, lungimea de undă corespunzătoare absorbției maxime a substanței țintă este aleasă pentru analiză. Această alegere asigură o sensibilitate maximă deoarece cel mai mare răspuns este obținut pentru o anumită concentrație de analit. Un exemplu de spectru de absorbție UV-Vis al colorantului Food Green 3 (Fast Green FCF, E143) și o curbă de calibrare corespunzătoare folosind soluții standard sunt prezentate în Figura 1.5. Se observă că acest colorant prezintă două vârfuri de absorbanta maximă, un vârf de absorbanta maximă mai mic la 435 nm și un vârf de absorbanta maximă mai intens la 619 nm. Pentru a obține sensibilitate maximă la calcularea unei concentrații necunoscute de Food Green 3, a fost utilizat pentru analiză vârful maxim de absorbție la 619 nm. Au fost preparate soluții standard într-un interval de concentrații cunoscute prin diluarea unei soluții stoc, luând măsurători de absorbanta și apoi trasându-le pe un grafic al absorbției în funcție de concentrație pentru a construi o relație numerică între concentrație și absorbanta. A fost creată o curbă de calibrare folosind o ecuație de regresie liniară prin metoda celor mai mici pătrate. Cu cât punctele de date sunt mai aproape de o linie dreaptă, cu atât potrivirea este mai bună. Interceptarea axei Oy în ecuația liniei drepte a fost setată la zero pentru a indica absența absorbției atunci când nu a fost prezent niciun colorant. Ecuația prezentată în Figura 1.5 este utilizată pentru a calcula concentrația de Food Green 3 (variabila x) într-o probă necunoscută pe baza absorbției măsurate (variabila y).

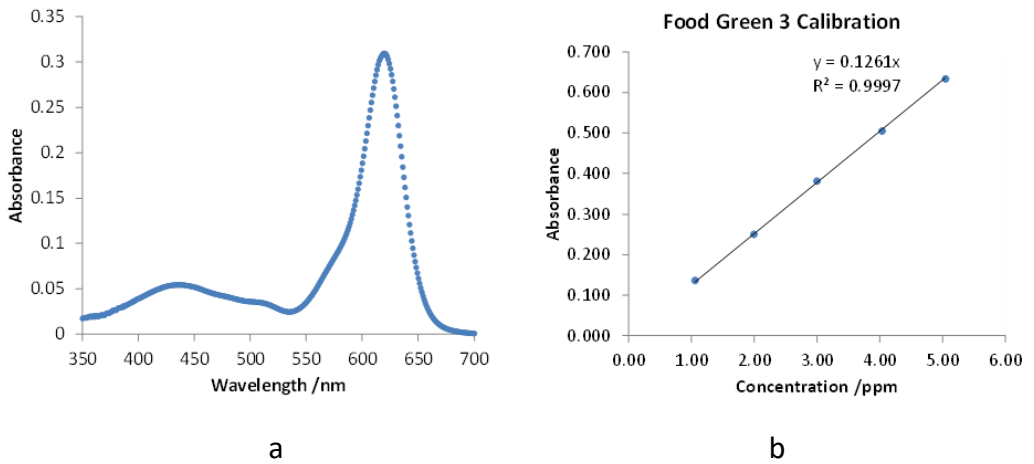


Figura 1.5. Spectru UV-Vis al colorantului Food Green 3 (a); Curbă de calibrare dezvoltată din soluții standard diluate de Food Green 3 folosind o ecuație de regresie liniară prin metoda celor mai mici pătrate (b) (după Justin, 2021).

Pentru analiza datelor, graficul absorbantei în funcție de concentrație poate indica cât de sensibil este sistemul la construirea unei curbe de calibrare. Când se utilizează o ecuație de regresie liniară cu metoda celor mai mici pătrate, panta liniei celei mai bune potriviri indică sensibilitatea. Dacă panta este mai abruptă, sensibilitatea este mai mare. Sensibilitatea este capacitatea de a diferenția între micile diferențe ale concentrației probei. Din legea lui Lambert-Beer, sensibilitatea poate fi parțial indicată de absorbivitatea molară  $\epsilon$ . Cunoașterea prealabilă a valorilor  $\epsilon$ , dacă este disponibilă, poate ajuta la determinarea concentrațiilor probelor, în special acolo unde probele sunt limitate sau costisitoare.

Pentru fiabilitate și bună practică, experimentele și citirile în spectroscopia UV-Vis trebuie repetate. Când se repetă examinarea unui eșantion, în general, un minim de trei încercări repetate este obișnuit, dar sunt necesare mult mai multe replicare în anumite domenii de activitate. O cantitate calculată, cum ar fi concentrația unei probe necunoscute, este de obicei raportată ca medie cu o abatere standard. Rezultatele reproductibile sunt esențiale pentru a asigura măsurători precise și de înaltă calitate.

---

Abaterea standard, abaterea standard relativă sau coeficientul de variație ajută la determinarea a cât de precise sunt sistemul și măsurătorile. O abatere sau o variație scăzută indică un nivel mai ridicat de precizie și fiabilitate.

## ANALIZA CROMATOGRAFICĂ

Analiza chimică cromatografică include mai multe metode de separare și totodată de analiză a componentelor amestecului din probă. Separarea precede analiza și se realizează prin repetarea, de un număr mare de ori, a echilibrului de distribuție între două faze. Una dintre faze este imobilă și poartă denumirea de fază staționară (aflată de regulă într-un tub numit coloană) iar cealaltă – faza mobilă – aflată în mișcare, se deplasează prin golurile primei faze. Separarea se petrece în coloana cromatografică.

Faza mobilă (eluent) se scurge cu viteză constantă prin interstițiile fazei staționare, adeseori poroase, și poate provoca migrarea, cu viteze diferite, a celor  $n$  componente ai amestecului de separat de-a lungul coloanei. După ce iese din coloană eluentul poartă numele de eluat.

Amestecul supus separării se introduce sub formă de soluție la începutul coloanei, folosindu-se un dispozitiv de introducere a probei (o microsiringă, autosampler) și se află fixat într-o zonă îngustă de la începutul coloanei. Spălați de eluent, o parte din componentii probei migrează apoi prin coloană cu viteze diferite. Acest fapt se datorează interacțiunilor fizice specifice dintre moleculele probei și faza staționară. Nu orice moleculă poate migra prin orice fază staționară. Efectul este numit retenție și provoacă o așa-numită migrare diferențiată.

Moleculele migrează în grupuri, în fiecare grup existând doar molecule de același fel. Aceasta face posibilă sesizarea componentelor, pe rând, la părăsirea coloanei, de către un instrument, în grupurile respective.

Instrumentul amintit este un analizor fizico-chimic, sensibil la mai mulți dintre componentii ce ies din coloană. Acest analizor, denumit detector, este capabil să dea un semnal proporțional cu masa sau cu concentrația soluției de component în faza mobilă.

Dispozitivul marchează trecerea fiecăreia dintre substanțele ce formează inițial proba, similar cu o fotocelulă care înregistrează trecerea concurenților la sosire în atletism.

În orice tip de cromatografie detectorul dă un semnal proporțional uneori cu concentrația, alteori cu masa componentului aflat în celula de măsură, semnal ce poate fi înregistrat în funcție de timp.

Diagrama semnal în funcție de timp sau de volumul de eluent poartă numele de cromatogramă.

Pe cromatogramă se disting o serie de maxime, numite picuri care se produc deasupra liniei de bază sau a porțiunii orizontale a curbei, paralelă cu axa timpului. Aceasta apare ori de câte ori în detector nu apare nici un component, în afara eluentului.

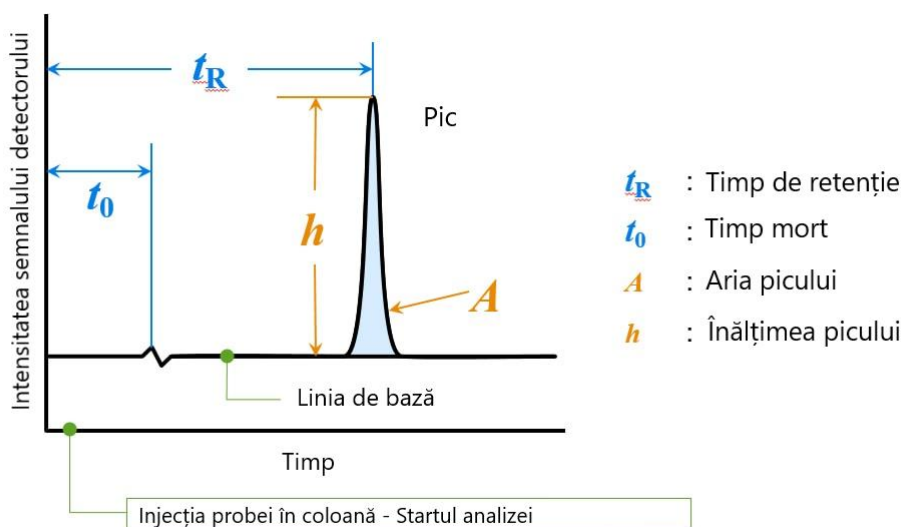


Figura 2.1. Elementele unei cromatograme.

Un pic are, în cazul ideal, forma distribuției normale Gauss (poate fi și deplasat stânga sau dreapta).

O cromatogramă este prezentată în figura 2.1. Pe axa absciselor se consideră timpul (sau volumul de eluent scurs), cu debit cunoscut, de la introducerea (injectarea) probei, iar pe cea a ordonatelor, semnalul detectorului.

Se disting următoarele elemente de bază ale cromatogramei:

1. Picurile cromatografice (vârfuri) care sunt semnalele valorificabile în analiza cantitativă și calitativă. Primul pic, mai mic, corespunde unui