

Н.Б. Еремеева

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ
ПРОДУКТОВ**



**Санкт-Петербург
2022**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Н.Б. Еремеева
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ
ПРОДУКТОВ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ
ИТМО

по направлению подготовки 19.03.01. Биотехнология
в качестве учебного пособия для реализации основных профессиональных
образовательных программ высшего образования бакалавриата

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Санкт-Петербург
2022

Еремеева Н.Б., Методы исследования пищевых продуктов– СПб:
Университет ИТМО, 2022. – 131 с.

Рецензент(ы):

Борисова Анна Викторовна, кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры "Технология и организация общественного питания", ФГБОУ ВО Самарский государственный технический университет;

В учебном пособии рассмотрены современные положения аналитической химии применительно к испытаниям пищевых продуктов. Описаны методы выделения и определения макрокомпонентов (белки, липиды, углеводы), так и микрокомпонентов (микроэлементы, витамины) и загрязнителей (пестициды, радиоактивных веществ и др.). Пособие предназначено для обучающихся по программе бакалавриата 19.03.01 Биотехнология при изучении дисциплины «Методы исследования в пищевой биотехнологии», с целью формирования базовых знаний необходимых для понимания особенностей методов проведения анализа пищевых продуктов при качественном и количественном определении основных компонентов пищевых продуктов.



Университет ИТМО – национальный исследовательский университет, ведущий вуз России в области информационных, фотонных и биохимических технологий. Альма-матер победителей международных соревнований по программированию – ICPC (единственный в мире семикратный чемпион), Google Code Jam, Facebook Hacker Cup, Яндекс.Алгоритм, Russian Code Cup, Topcoder Open и др. Приоритетные направления: IT, фотоника, робототехника, квантовые коммуникации, трансляционная медицина, Life Sciences, Art&Science, Science Communication. Входит в ТОП-100 по направлению «Автоматизация и управление» Шанхайского предметного рейтинга (ARWU) и занимает 74 место в мире в британском предметном рейтинге QS по компьютерным наукам (Computer Science and Information Systems). С 2013 по 2020 гг. – лидер Проекта 5–100.

© Университет ИТМО, 2022
© Еремеева Н.Б., 2022

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА АНАЛИТИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТОВ	8
1.1 Качество аналитических результатов.....	8
1.2 Европейские и международные нормативные документы	10
1.3 Контроль и оценка качества	10
1.4 Обеспечение качества в полном аналитическом цикле	11
1.5 Требования к качеству аналитических результатов	12
1.5.1 Метрологическая отслеживаемость	13
1.5.2 Неопределенность результата измерения	16
2 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ	20
2.1 Неопределенность и прецизионность	20
2.2 Определение неопределенности	21
2.4 Точность и смещение	24
3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ	27
4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОСТИ	29
5 АНАЛИЗ БЕЛКОВ, ПЕПТИДОВ И АМИНОКИСЛОТ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ	30
5.1 Нутритивные свойства белка.....	30
5.1.1 Качество белка.....	30
5.1.2 Усвояемость.....	33
5.1.2.1 Конформация белка.....	34
5.1.2.2 Факторы, снижающие биологическую ценность (антипитательные)	34
5.1.2.3 Промышленная переработка.....	34
5.1.3 Оценка биологической ценности белков	34
5.1.3.1 Биологические методы	35
5.1.3.2 Химические методы	36
5.1.3.3 Ферментативные и микробиологические методы	38
5.2 Анализ белков, пептидов и аминокислот: основные рекомендации	38
5.2.1 Извлечение и очистка белков	38
Центрифугирование	43
Диализ и электродиализ	44
Групповая очистка и фракционирование белков с использованием улавливающих хроматографических колонок.....	45
5.2.2 Аналитические методы определения содержания белков, пептидов и аминокислот	46
Биуретовый метод и его модификации	49
Спектрофотометрический метод с применением 2,4,6-тринитробензол-1 - сульфоновой кислоты.	54
Метод Поупа и Стивенса	55
Формольное титрование	56
Бицинхоновый метод	56
Нингидриновый метод	57

5.2.3	Определение аминокислотного состава пищевых продуктов	58
	<i>Гидролиз белков для определения аминокислотного состава</i>	59
6	МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДОВ В ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ И	
	ПРОДУКТАХ ПЕРЕРАБОТКИ	61
6.1	Методы определения жиров	62
	Количественный анализ молекулярных видов распространенных липидных	
	классов методами ВЭЖХ.....	70
6.2	Способы измерения степени окисления липидов	71
6.2.1	Органолептический анализ	71
6.2.2	Первичные продукты окисления	72
6.2.3	Конъюгированные двойные связи	72
6.2.4	Гидропероксиды липидов	73
6.2.5	Вторичные продукты окисления	73
6.2.6	Анализ летучих вторичных продуктов окисления	74
6.2.7	Карбонильные соединения.....	74
6.2.8	ТБК-тест (тиобарбитуровой кислоты).....	75
6.3	Липидомика – новая область анализа липидов	76
7	МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ УГЛЕВОДОВ В СЫРЬЕ И ПРОДУКТАХ	
	ПИТАНИЯ	78
7.1	Классификация и строение углеводов	79
	<i>Простые углеводы. Моно- и дисахариды.....</i>	79
	<i>Полиолы</i>	79
	<i>Олигосахариды</i>	80
	<i>Полисахариды.....</i>	80
	<i>Конъюгированные углеводы</i>	80
7.2	Подготовка проб для проведения анализа	81
	<i>Экстракция и фракционирование</i>	81
7.3	Методы определения углеводов	85
7.4	Современные методы анализа углеводов в пищевых продуктах	92
	<i>Спектроскопические методы</i>	92
	<i>Газовая хроматография</i>	94
	<i>Высокоэффективная жидкостная хроматография</i>	96
8	МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА	98
8.1	Биологическая ценность минеральных веществ.....	98
8.2	Приготовление аналитического раствора	102
	Гомогенизация.....	104
	Сухое озоление.....	105
	Мокрое озоление	107
8.3	Определение содержания токсичных металлов	110
	Метод атомно-абсорбционной спектрометрии	111
	<i>Пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия.....</i>	111
	Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой.....	112
	Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой	113
	Электрохимические методы	114
	<i>Контрольные вопросы</i>	115

9 ВИТАМИНЫ	116
9.1 Методы анализа витаминов	117
Операции подготовки проб.....	119
9.2 Жирорастворимые витамины	120
9.3 Водорастворимые витамины	121
<i>Витамины группы В</i>	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	127

ВВЕДЕНИЕ

Безопасность пищевых продуктов является насущной проблемой современного общества. Существующие обязательные санитарно-гигиенические нормы не дают гарантии безопасности пищевой продукции. Повышение требований потребителей и возникающие потребности фирм-производителей пищевых продуктов требуют разработки и внедрения эффективных систем менеджмента их безопасности, в которых особое место отводится контролю качества.

В настоящее время контроль физико-химических свойств и показателей безопасности пищевых продуктов включает проверку соответствия продукции требованиям нормативной документации относительно тяжелых металлов, радионуклидов, пестицидов, других химических загрязняющих веществ, патогенных микроорганизмов, простейших, гельминтов и биологических токсинов, которые подставляют опасность для здоровья человека.

В последнее время все острее становится проблема подлинности и идентичности пищевых продуктов, причем критерии этих понятий постепенно размываются. Замена или изъятие пищевых компонентов из состава традиционных пищевых продуктов не всегда безопасна для здоровья человека. Проблема идентичности пищевых продуктов связана также и особенностями стехиометрического строения молекул нутриентов, поскольку существующие *D*- и *L*-изомерные формы аминокислот и сахаров, а также *цис*- и *транс*-изомеры жирных кислот проявляют в организме человека различные свойства.

Общеизвестно, что здоровье человека первостепенно зависит от качества и характера его питания. Дисбаланс питания представляет собой важнейший фактор развития ряда социально-значимых заболеваний, а именно заболевания сердечно-сосудистой системы, сахарный диабет, онкологические заболевания, ожирение и др., которые приводят к сокращению продолжительности жизни, снижению ее качества, в том числе и к преждевременной инвалидности. Важно учитывать роль питания в развитии детей, особенно раннего возраста, так как оно закладывает фундамент правильного развития и здоровья на всю жизнь.

Питание также является одним из важнейших рычагов сохранения и улучшения здоровья, увеличения продолжительности жизни, ее активного периода, повышения работоспособности. Поэтому вопросы питания являются одним из ключевых факторов при формировании здорового образа жизни и профилактики неинфекционных заболеваниях, обсуждаются и решаются не только медицинской общественностью, но и государством.

Блага цивилизации в развитых странах привели к тому, что существенно снизились энерготраты населения при сохранении прежней потребности в микронутриентах. Проще говоря, рацион современного человека должен включать в себя продукты с меньшей энергетической ценностью, при этом обладать повышенной пищевой плотностью. Эти условия необходимы для поддержания баланса в физиологической потребности человека в пищевых и биологически активных веществах. Одним из путей достижения этих условий является направленная технологическая модификация во время производства,

что приведет к получению пищевого продукта с заданным химическим составом.

В основе развития таких технологий должно быть понимание об исходном составе производственного сырья и пищевых продуктов, их вариации из-за различных внешних и внутренних факторов. Знания химического состава пищевых продуктов позволяют оценить соответствие рациона потребностям человека.

Изучение химического состава пищевых продуктов является непрерывной работой и не может быть когда-либо завершена, так как это постоянно меняющаяся величина. Развитие технологий существенно меняет ассортимент пищевых продуктов, что особенно заметно в последние десятилетия. Одновременно с этим развивается и совершенствуется приборная база, открываются новые возможности для более точной оценки химического состава. Все это приводит к потребности проведения новых систематических исследований, создания и обновления необходимых данных о химическом составе пищевых продуктов.

Данное учебное пособие включает в себя материал по химии макро- и микронутриентов пищевых продуктов и продовольственного сырья. Основное внимание уделяется их современным методам их исследования, что даст представление о их химическом составе и качестве. Пособие предназначено для обучающихся по программе бакалавриата 19.03.01 Биотехнология при изучении дисциплины «Методы исследования в пищевой биотехнологии», с целью формирования базовых знаний необходимых для понимания особенностей методов проведения анализа пищевых продуктов при качественном и количественном определении основных компонентов пищевых продуктов. Учебный курс включает в себя 32 ч лекций, 24 ч практических занятий и 24 ч лабораторного практикума, а также 60 ч самостоятельной работы. Учебное пособие будет полезно как при освоении теоретического курса, так и при подготовке к практическим и лабораторным занятиям, так как содержит теоретические аспекты изложенных методов анализа, возможность их практического применения и интерпретаций полученных результатов. В конце каждой главы есть контрольные вопросы, которые позволят самостоятельно оценить степень освоения материала.

1 ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА АНАЛИТИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ежедневно в лабораториях контроля качества пищевых продуктов выполняются тысячи аналитических измерений. Тенденция к росту числа выполняемых измерений напрямую связана с постоянным увеличением количества национальных и международных нормативных документов и растущими объемами международной торговли. Исполнение законодательных актов и нормативов затрагивает процесс принятия решений, базирующийся на анализе результатов круговых тестов, полученных аналитическими лабораториями. Результаты низкого качества могут привести к ошибочным выводам и, как следствие, неправильным управленческим решениям.

1.1 Качество аналитических результатов

Понятие «качество» определяется как «степень, в которой некоторая совокупность внутренне присущих характеристик соответствует заданным требованиям» [1]. Качество измерений в аналитической химии связано с получением результатов с определенной степенью достоверности.

На практике качество выражается двумя дополнительными характеристиками, а именно надежностью и полезностью [2]. В то время как надежность включает получение реальных результатов, которые достаточно точны и достоверны, полезность отражает возможность принятия правильного управленческого решения по вопросам качества и/или безопасности продукта, которое основано на получении аналитических результатов. Таким образом, надежность аналитических результатов – это условие для принятия правильных управленческих решений.

Основной задачей регламентов официального контроля качества пищевых продуктов на европейском уровне [1] является повышение требований стандартов безопасности пищевых продуктов и защиты потребителя. Поэтому набор лаборатории, занимающиеся анализом образцов пищевых продуктов, обязаны работать в соответствии со всемирно признанными процедурами или стандартами эффективности, используя при этом максимально обоснованные методы анализа.

Уполномоченные контролирующие организации помогают компетентным органам государств-членов отслеживать выполнение требований, установленных в соответствующих законах о пищевых продуктах и кормах. Например, наличие вредных соединений в пищевых продуктах регулируется путем установления максимально допустимого их содержания или запрета определенных веществ. Роль контролирующей лаборатории в этом случае – обеспечить минимизацию потенциальных рисков их потребления. Хорошим примером, когда контроль качества пищевых продуктов имеет первостепенное значение, являются неправильные условия хранения определенных пищевых продуктов, которые могут привести к возникновению потенциально канцерогенных микотоксинов. Партия импортного арахиса, проверка которой соответствующими санитарными службами порта выявила присутствие

афлатоксинов в количестве выше разрешенных уровней, автоматически подлежит изъятию с продовольственного рынка. Это решение, кроме очевидной пользы для здоровья населения, может иметь и другие важные экономические или даже политические последствия.

Последствием ошибочной оценки качества пищевых продуктов является возникновение рисков для здоровья, экономические потери или противоправная деятельность, которая заканчивается судебными процессами. Другим часто встречающимся явлением является фальсификация пищевых продуктов. Например, может использоваться смесь различных дешевых растительных масел, не соответствующих декларации на этикетке, то есть имеет место мошенничество. Всегда, когда такие случаи обнаруживаются и становятся достоянием общественности, они влекут за собой недоверие потребителей к качеству пищевых продуктов.

Основным аспектом надежности аналитических результатов является их сопоставимость в отношении идентичности и содержания аналитов, определенных в различных лабораториях и в разное время. Чтобы результаты были сопоставимыми, они должны сравниваться с соответствующими эталонами и быть представлены с указанием неопределенности измерений. В нашем распоряжении имеются различные средства для выполнения этих требований (рис. 1.1). Использование эталонных материалов, валидация аналитических методов и участие в межлабораторных испытаниях (круговых тестах) – основные подходы для получения надежных аналитических результатов. Вышеупомянутые и другие необходимые условия для достижения полной уверенности в соблюдении заданных требований к качеству называются обеспечением качества аналитических результатов (*analytical quality assurance – AQA*).

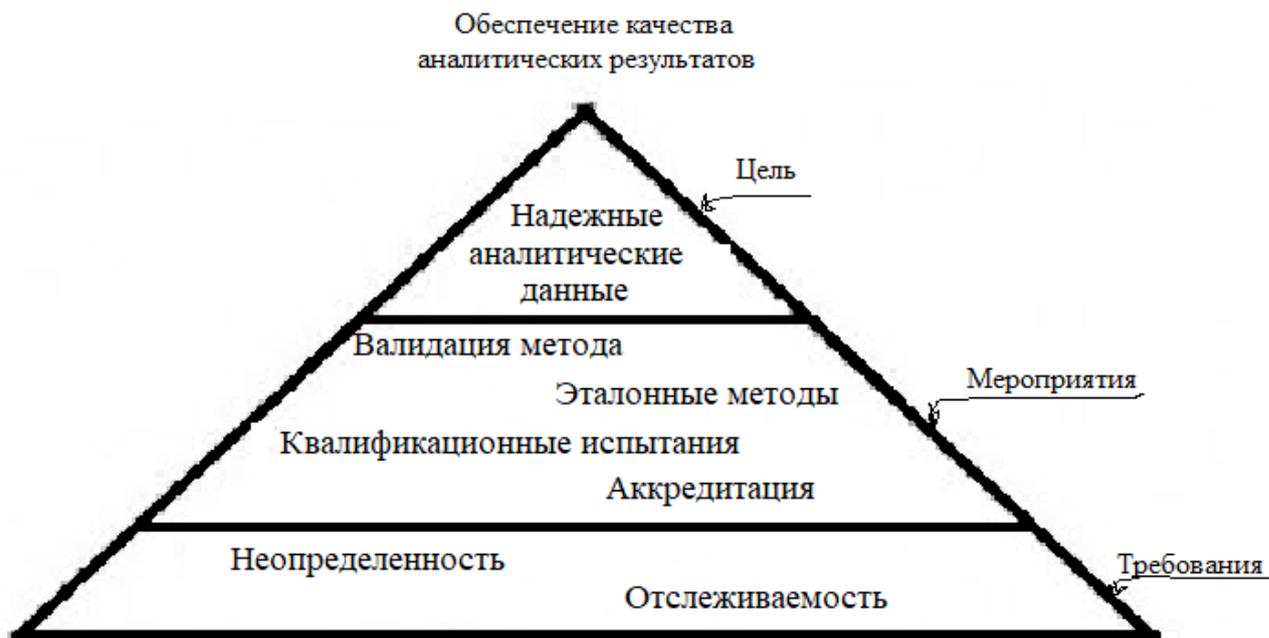


Рис. 1.1. Концепция обеспечения качества аналитических результатов

1.2 Европейские и международные нормативные документы

В идеале качество аналитических результатов должно обеспечиваться унификацией на международном уровне. Для этого такие международные организации, как Международная организация по стандартизации (*International Standardization Organization – ISO*), Международный союз теоретической и прикладной химии (*IUPAC*) и Центр аналитической химии в Европе (*Eurachem*), разработали ряд руководств и стандартов, которые формализуют и гармонизируют принципы АQA. В Европе многие работы в этой области выполняются *Eurachem*, сетью организаций, занимающихся аналитической химией и проблемами качества. Наиболее широко признанными являются три руководства Кооперации по международной прослеживаемости в аналитической химии (*Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry – CITAC*)/*Eurachem*: по качеству в аналитической химии, по отслеживаемости химических измерений и по неопределенности химических измерений. *Eurachem* также разработал ряд других руководств по таким темам, как валидация метода и эталонные материалы. Кроме того, дополнительные стандарты имеются у других регулирующих органов, таких как бюро стандартизации и рабочие группы. Некоторые нормативные документы принимаются комиссией ФАО/ВОЗ «Кодекс Алиментариус» для поддержки усилий, направленных на общую гармонизацию обеспечения качества пищевых продуктов. Эти усилия поддерживаются все большим количеством аналитических лабораторий, напрямую заинтересованных в том, чтобы быть признанными квалифицированными компетентными органами для решения подобных задач.

1.3 Контроль и оценка качества

Система АQA описывает общие плановые и систематические мероприятия, осуществляемые лабораторией для обеспечения надежности выполняемых измерений. Руководство *CITAC/Eurachem* по качеству в аналитической химии содержит список компонентов системы обеспечения качества: требования к помещениям лабораторий; уровень образования и квалификации персонала; перечень обучающих процедур и отчетность; график поверки и калибровки оборудования и приборов; документированные и валидированные методы; отслеживаемость и погрешность измерений; применение процедур контроля качества; профилактические и корректирующие действия; проверка квалификации персонала; внутренний аудит; процедуры рассмотрения претензий; требования к реагентам, калибровочным стандартам, измерительным стандартам и эталонам. Все это образует гибкую схему системы обеспечения качества, чаще всего подкрепленную аккредитацией по европейским и международным стандартам, таким как *ISO/IEC 17025*. Аккредитация как формальное признание компетентности лаборатории в выполнении определенных измерений является последним этапом внедрения системы обеспечения качества.

Качество должно непрерывно проверяться. Для описания системы обеспечения качества в аналитической лаборатории используются два термина:

контроль качества и оценка качества. Контроль качества обычно более характерен для лабораторий предприятий. Он связан с качеством результатов, полученных для конкретных образцов или партий, и определяется как мероприятия, выполняемые для каждой серии измерений в целях контроля потенциальных ошибок, которые могут произойти при выполнении анализа. В целом, разработка метода и определение его показателей эффективности не гарантируют постоянного получения удовлетворительных результатов. Внутренняя система контроля качества содержит в себе механизм для проверки выхода результатов за допустимые границы, предполагающий использование контрольных карт, анализа эталонных образцов или анализ «слепых», «холостых» или «обогащенных» образцов (метод добавок) в соответствии с документацией по контролю качества. В случае выхода результатов за допустимые границы система переходит в режим корректирующих действий.

Оценка качества является более широким понятием. Она охватывает все меры, которые могут использоваться для оценки эффективности лаборатории и способные подтвердить, что система качества функционирует должным образом и в допустимых пределах. Существуют различные уровни оценки качества. Оценка аналитических методов в малом масштабе имеет место каждые сутки в процессе получения и накопления данных или оптимизации аналитических условий. Кроме того, проводится валидация метода – оценка пригодности метода для его предполагаемого использования. Впоследствии оценка разработанного метода и эффективности лаборатории осуществляется, например, путем участия лаборатории в схемах *PT* или анализа сертифицированных эталонных образцов. Наконец, качество всей системы должно проверяться на регулярной основе с привлечением внутренних или внешних аудитов или экспертиз. Этот тип проверки производится путем оценки документов по контролю качества (руководства, протоколы, стандартные рабочие операции, отчеты о валидации или калибровке).

Диапазон доступных способов оценки зависит в основном от типа лаборатории. Если лаборатория имеет формальную систему обеспечения качества, оценка проводится согласно формальным процедурам, как правило, в форме внутренних и внешних аудитов, обязательной валидации аналитических методов и регулярного участия в оценке квалификации персонала. Тем не менее, если речь идет о научно-исследовательской лаборатории, где применяются нерутинные (нестандартные) методы, ее эффективность можно оценить по количеству патентов, публикаций, аспирантов и докторантов, при этом могут использоваться внешние параметры, например, индекс цитирования Института научной информации (*Institute for Scientific Information – ISI*), а также количество и качество публикаций, планы проектов и отчеты экспертных групп.

1.4 Обеспечение качества в полном аналитическом цикле

Химический анализ представляет собой многоступенчатый процесс в целях определения тех или иных свойств, например, типа и количества целевых компонентов в данном образце. Аналитическая процедура, приведенная в виде

общей блок-схемы на рис. 1.2, всегда начинается с постановки аналитической проблемы (например, установление содержания метилртути в мясе тунца) и заканчивается оценкой полученных результатов и процессом принятия решений (например, решения о пригодности рыбы для употребления в пищу). В полный аналитический цикл входят также отбор, подготовка образцов и аналитическое измерение.



Рис. 1.2. Блок-схема полного аналитического процесса

Для получения надежных результатов система обеспечения качества охватывает все стадии процесса. Это предполагает описание методологии, валидацию и контроль документации. Отсутствие контроля над одной из стадий полного аналитического цикла приводит к возникновению риска получения некачественного окончательного результата. Это касается, как правило, этапов отбора образцов подготовки образцов к анализу, поскольку эти операции считаются самыми слабыми звеньями методик. Аналогичным образом некорректное планирование эксперимента и заключительная статистическая обработка результатов приводят к обесцениванию тщательно выполненных лабораторных экспериментов. Как правило, любой аналитический цикл требует однозначной цели, методологии эксперимента, а также подробных процедурных инструкций и критериев эффективности, включая корректирующие действия. Требования и мероприятия, описанные ниже, типичны для любого аналитического цикла независимо от области применения метода.

1.5 Требования к качеству аналитических результатов

Согласно *IUPAC*, целью выполнения измерения является предоставление информации (в виде результата измерения) о значении измеряемой

характеристики. Более того, наряду с предоставляемым значением измеряемой характеристики должна быть доступна и соответствующая неопределенность измерения, и метрологическая отслеживаемость (см. рис. 1.1) [9].

1.5.1 Метрологическая отслеживаемость

Метрологическая отслеживаемость определяется как «свойство результата измерения, посредством которого результат может быть связан с некоторым эталоном через документированную неразрывную цепь калибровок, каждая из которых вносит свой вклад в погрешность измерения» [2]. На практике установление отслеживаемости представляет значительные трудности, так как на цепь отслеживаемости могут влиять различные факторы, например определение измеряемой характеристики или отслеживаемость калибраторов.

Результат может быть связан с различными типами эталонов [2]:

- единица измерения;
- метод измерения;
- измерительный стандарт.

Наиболее предпочтительно установление отслеживаемости к международной системе единиц (СИ). Установление отслеживаемости к СИ в химическом анализе возможно, если все оборудование, используемое в процессе, калибруется с использованием стандартов, которые сами отслеживаются к СИ. Простым примером, поясняющим цепь калибровок, может служить использование аналитических весов. Все весы регулярно калибруют путем использования для этого эталонов веса, которые сертифицируются путем сравнения со стандартами более высокого уровня. Последние калибруются по национальным стандартам, которые привязаны к международному эталону килограмма, хранящемуся в Международном бюро мер и весов в Париже. Другими словами, каждый калибратор в цепи имеет количественное значение, определенное путем сравнения с предшествующим калибратором. Если неопределенность конкретных звеньев этой цепи известна, то можно оценить общую неопределенность выполненного измерения массы. Когда результаты отслеживаются относительно одного эталона, они сопоставимы, даже если получены в разных лабораториях и в разное время. Это, в сущности, и есть основной смысл отслеживаемости.

При первом удобном случае результаты необходимо приводить к определенной единице измерения (в случае химических измерений обычно к моллю или килограмму), поскольку тогда значения не зависят от метода или артефакта и везде одинаково валидны. К сожалению, в пищевой химии это сделать не всегда возможно, поскольку аналит зачастую определяют с помощью функциональных показателей, например, сумма экстрагируемого жира или сумма ненасыщенных жиров характеризуется йодным числом, а содержание пищевой клетчатки или белка – по содержанию общего азота. В таких случаях измеряются «определяемые методом» свойства, и эталон тесно связан с документированным протоколом, описывающим аналитическую процедуру. Определяемая методом цепь отслеживаемости сохраняется до тех пор, пока процедура строго выполняется. Основной недостаток этого подхода –

результаты сопоставимы только в том случае, если они получены тем же самым методом в идентичных аналитических условиях.

Эталоны отслеживаемости третьего типа – измерительные стандарты – могут быть представлены артефактами. Например, если концентрация вещества вычисляется непосредственно по измерениям оптической плотности, результаты отслеживаются по справочным данным оптической плотности. Аналогичным образом, при измерении количества вещества, основанном на биологической активности (например, витаминов или гормонов), зачастую применяют так называемые «международные единицы», определенные произвольно Комитетом по биологической стандартизации ВОЗ [2].

Сложность методов, используемых при анализе пищевых продуктов, обусловленная последовательностью аналитических этапов и операций (экстрагирование, очистка, дериватизация, разделение и обнаружение), может привести к потере информации вследствие загрязнения, взаимодействий или неполного восстановления аналита и тем самым вызвать смещение. В этом случае отслеживаемость обеспечивается либо привязкой результатов к методу, либо оценкой смещения. Последняя возможна при использовании *CRM* (*certified reference materials* – сертифицированных эталонных материалов) в качестве измерительных стандартов. Очевидно, если значение свойства *CRM* отслеживается к СИ, то измерение в принципе может также отслеживаться к СИ. Тем не менее, если состав образцов и *CRM* недостаточно сопоставим, погрешность результата может быть большой [23].

Результаты химических измерений вычисляют преимущественно косвенным путем по измерению свойств, отличных от интересующего свойства, таких, как масса объем и концентрация компонентов, реагентов или стандартов. Чтобы обеспечить отслеживаемость результата, все промежуточные измерения, вовлеченные в аналитический цикл, также должны быть отслеживаемыми. Необходимо также учитывать количество показателей, которые не присутствуют в конечном уравнении, но используются для контроля анализа и могут влиять на результат.

Отслеживаемость результатов может быть установлена посредством [23]:

- отслеживаемых стандартов для калибровки аналитического оборудования;
- нематричных и матричных *CRM*;
- первичного метода или сравнения с результатами первичного метода;
- стандартизированной или точно определенной процедуры.

Калибровка с использованием подходящих стандартов – ключевая операция в установлении отслеживаемости. Калибровка определяет соотношение между количественными значениями определяемого показателя, имеющимися измерительными стандартами и соответствующими показаниями (например, прибора), и использует эту информацию для получения результата измерения [2]. В типичном способе калибровки известное количество измерительного стандарта (например, сертифицированного стандарта)

подвергают всем операциям аналитического цикла и наблюдают аналитический отклик. Степень отслеживаемости, частота и диапазон калибровки – основные аспекты, которые должны при этом приниматься во внимание.

Частота калибровки зависит от надежности работы измерительной аппаратуры, тогда как ее диапазон зависит от сложности системы. Обычно каждая часть измерительной системы калибруется отдельно и вносит свой вклад в погрешность измерения. Отдельные процедуры калибровки аналитического оборудования основываются преимущественно на использовании гравиметрически подготовленных чистых веществ (сертифицированной чистоты) или растворов эталонных материалов. Тем не менее, для многих многостадийных анализов эталонные материалы с соответствующим матриксом проверяют в течение всего аналитического цикла, поскольку это может быть единственным способом оценки смещения (часто представляемой показателями восстановления) для последующей коррекции результатов [23]. Если подходящие эталонные материалы недоступны, оценка различия в откликах измерительной системы на используемые стандарты и на исследуемый образец может выполняться методом добавок стандарта к исследуемому образцу.

Требования к калибровке зависят от того, выполняется ли относительная оценка (например, повторяемость), или требуется определить абсолютные значения измеряемой характеристики (например, для анализа истинности). В первом случае обычно приемлема отслеживаемость к внутренним стандартам, однако надежность определения абсолютного значения возрастает с классом используемых стандартов вплоть до международных. Кроме того, строгая отслеживаемость необходима для вспомогательных измерений, производимых для контроля метода, если они заметно влияют на результат (например, необходимо тщательно калибровать термометры, используемые для определения ферментативной активности).

Первичные методы или первичные процедуры – это методы, результаты которых напрямую отслеживаются в СИ без каких-либо ссылок на внешний стандарт той же величины (характеристики). Они рассматриваются как имеющие самое высокое метрологическое качество и гарантируют минимально допустимую погрешность измерения. Первичные методы используются, как правило, для относительно простых измерительных методов, таких, например, как гравиметрия, титриметрия и кулонометрия простых гомогенных растворов, а также для определения микроэлементов в этих растворах методом масс-спектрометрии с изотопным разбавлением. Для определения органических соединений в сложных пищевых матриксах не существует первичных методов, поскольку из-за присутствия одной или нескольких предварительных аналитических операций (например, включающих экстрагирование или химические реакции) невозможно полностью описать и надежно обеспечить 100 %-ное извлечение аналита.

Если результат не может быть получен первичным методом, то, сравнивая его с результатом, полученным с помощью первичного метода или иным

другим способом, связанным с СИ, его можно, по меньшей мере, связать со стандартизированной процедурой.

Установление отслеживаемости не гарантирует идентичности результатов, однако обеспечивает сопоставимость результатов за счет обеспечения единства единиц измерения. Если требуется определить, насколько один результат больше или меньше другого с заданной доверительной вероятности, необходима информация о значении погрешности.

1.5.2 Неопределенность результата измерения

Согласно ISO/IEC 17025 Г41, интерпретация аналитического результата возможна только тогда, когда он представлен в виде двух значений:

(РЕЗУЛЬТАТ) : $(x \pm U)$ (единицы)

где x – измеренное значение характеристики; U – неопределенность при заданном доверительном уровне.

Неопределенность (погрешность) измерения в настоящее время определяется как «неотрицательный параметр, характеризующий дисперсию значений, приписываемых измеряемой характеристике, и основанный на использованной информации». Строго говоря, неопределенность – количественная оценка диапазона значений, в котором может находиться результат измерения (например, концентрация аналита) [1]. В этом смысле она не подвергает сомнению результат, а совсем наоборот – указание неопределенности увеличивает уверенность в валидности аналитического результата. Например, если по пищевому законодательству арахис не должен содержать более 2 мкг афлатоксина В₁/кг, то производитель обязан проанализировать каждую партию и гарантировать, что данный уровень не превышен. Предположим, что полученный результат равен 1,8 мкг/кг. Если неопределенность этого результата, представленная в виде половины длины интервала, составляет 0,1 мкг/кг, то можно ожидать, что концентрация этого токсина в продукте находится в интервале 1,7-1,9 мкг/кг и с высокой вероятностью не превышает максимальное допустимое значение. С другой стороны, если неопределенность составляет 0,5 мкг/кг, то уже не будет достаточной гарантии, что этот арахис безопасен для потребления.

Существует огромное разнообразие факторов, которые могут влиять на неопределенность измерения. Были выделены следующие потенциальные источники неопределенности [23]:

- неполное определение измеряемой величины (характеристики);
- отбор и условия хранения образцов;
- влияние измерительной аппаратуры (например, неопределенность весов и волюметрического оборудования, разрешение и селективность инструмента);
- значения, назначенные стандартам, чистота реагентов;
- предположения и аппроксимация, используемые в процедуре измерения (например, предполагаемая стехиометрия, значения констант и справочные данные);

- условия измерения, неполная оценка влияния окружающих условий на процедуру;
- влияние образцов (например, неполное экстрагирование, влияние матрикса продукта и взаимодействия, поправка на «холостой» образец);
- влияние операторов (например, загрязнение во время отбора образцов, неправильная подготовка образцов, индивидуальное смещение при чтении показаний аналоговых приборов);
- случайная вариация.

Большинство из этих факторов неизбежно присутствует в аналитическом цикле. Все они как источники ошибок влияют на значение измеряемой величины и заставляют его отклоняться от истинного значения. Важно, тем не менее, различать термины «неопределенность», «точность» и «ошибка». Соотношения между этими понятиями показаны на рис. 1.3. Чтобы полностью оценить неопределенность измерения, необходимо учитывать два компонента: стандартное отклонение и смещение. Стандартное отклонение показывает степень повторяемости и/или воспроизводимости измерения, тогда как смещение связано с присущими методу систематическими эффектами. Оба термина являются количественным выражением двух компонентов ошибки – случайной и систематической. Ошибка обычно связывается с точностью аналитического метода и определяется как «разница между результатом и истинным значением измеряемой величины». В отличие от неопределенности, ошибка – это одно значение. Случайная ошибка возникает из различных непредсказуемых эффектов, влияющих на измеряемую величину, и является мерой прецизионности измерения. Так как она непредсказуема, ее нельзя компенсировать, но можно уменьшить, увеличивая количество повторных измерений. В отличие от случайной, систематическая ошибка является постоянной частью общей ошибки (или, по меньшей мере, изменяется предсказуемым способом) и потому может использоваться для коррекции результата, однако ее нельзя уменьшить путем увеличения количества измерений. Этот компонент общей ошибки влияет на правильность измерения. Правильность вместе с прецизионностью определяет точность аналитического результата, которая является одной из характеристик эффективности метода и определяет «близость между измеренным и истинным значением измеряемой величины (характеристики)».

Неопределенность как статистический параметр никогда нельзя вычислить точно, но ее можно оценить с большей или меньшей вероятностью. В литературе описано много теоретических подходов к оценке неопределенности [23]. Всех их можно сгруппировать в две основные группы: так называемые восходящие (снизу-вверх) и нисходящие (сверху-вниз) методы.

Восходящий метод может применяться только тогда, когда аналитический метод хорошо понятен. Он основывается на идентификации, количественном определении и сочетании потенциальных источников неопределенности. Для идентификации всех компонентов неопределенности измерения часто

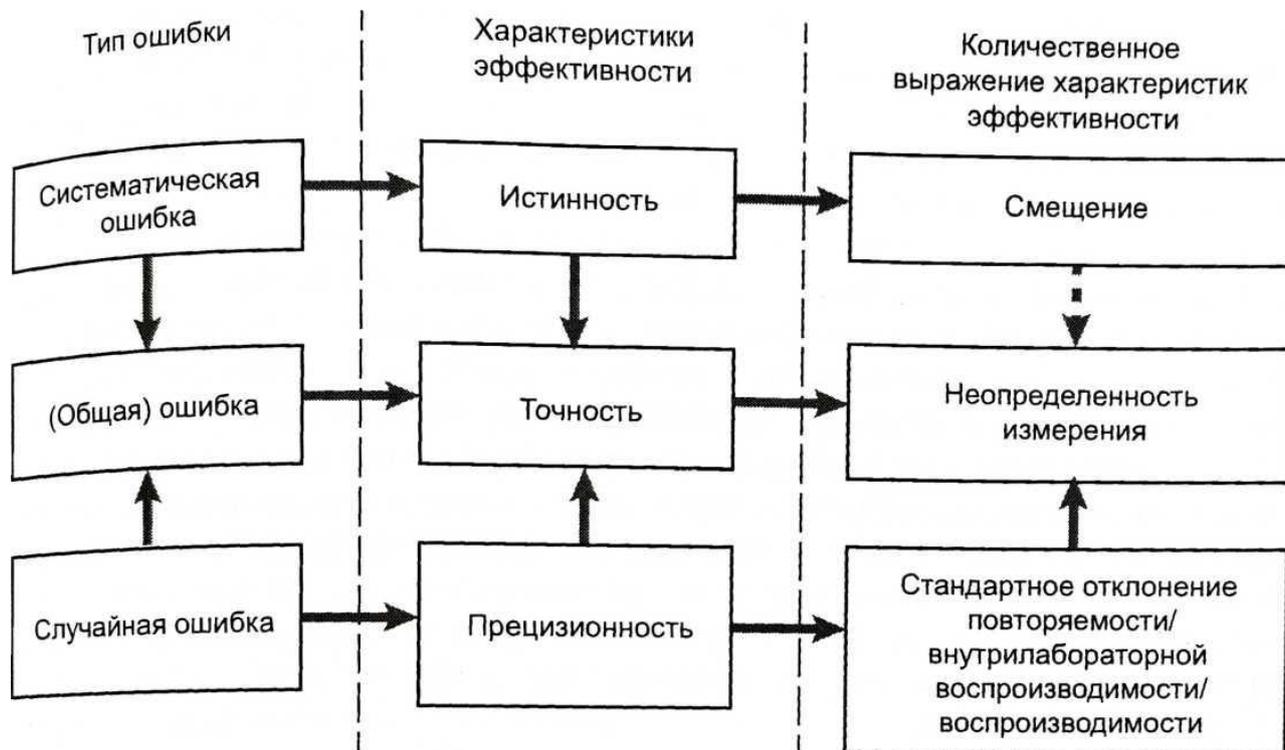


Рис. 1.3. Зависимость между ошибкой, точностью и неопределенностью измерения

исследуется как последовательность отдельных операций (например, взвешивание, растворение, экстрагирование), и их индивидуальные вклады выражаются в виде стандартных отклонений (стандартных неопределенностей). Затем они объединяются согласно закону распространения ошибок. Полученная объединенная неопределенность, умноженная на подходящий коэффициент охвата, дает так называемую расширенную неопределенность.

Для применения восходящего метода обычно требуется немного (или совсем не требуется) экспериментальных данных, поскольку компоненты неопределенности можно оценить по информации, полученной, например, от производителя для лабораторного оборудования или из сертификатов калибровки, или даже используя личные суждения опытного аналитика. Восходящая стратегия оценивает значимость отдельных компонентов, тем самым обеспечивая превосходную исходную точку для потенциального улучшения метода. Недостаток этого подхода связан с длительным процессом анализа, который редко выполняется, и с предрасположенностью (из-за использования зачастую сложных математических моделей) к математическим ошибкам и пропуску важных эффектов.

В нисходящем подходе применяется противоположный принцип. В этом случае оценка основывается на данных об эффективности метода, таких как результаты валидации или межлабораторных сравнений, полученные для оценки неопределенности. Поэтому основное отличие этого подхода от восходящего метода состоит в том, что аналитический цикл рассматривается как «черный ящик», а для определения комбинированного влияния многих промежуточных эффектов используются такие общие параметры эффективности метода, как повторяемость, воспроизводимость и правильность. Как и в восходящем методе, все частные неопределенности должны выражаться

стандартными отклонениями, объединяться и умножаться на соответствующий коэффициент охвата.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение аналитическому результату и его качеству.
2. Что такое надежность аналитических результатов?
3. Назовите основные российские, европейские и международные нормативные документы в области качества аналитических результатов.
4. Что является полным аналитическим циклом?
5. Каким образом может быть установлена отслеживаемость результатов?
6. Перечислите основные источники неопределенности измерения.
7. Объясните зависимость между ошибкой, точностью и неопределенностью измерения.

2 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Большинство инструментальных методов количественного анализа пищевых продуктов заключаются в измерении каких-либо параметров и установлении зависимости между ними и концентрацией определяемого компонента в пищевом продукте.

Можно выделить два основных способа использования статистических методов в количественном анализе пищевых продуктов. Первый способ – оценка точности определения концентрации целевого компонента в пробе в лабораторных условиях. Для этой цели можно использовать, например, контрольный образец и стандартный метод анализа, а результат сравнить с опубликованными данными или данными других лабораторий. Второй способ – проведение калибровки прибора с использованием серии стандартов и разработка новой методики анализа, которая будет в дальнейшем использоваться для оценки концентрации целевого компонента в пробе.

2.1 Неопределенность и прецизионность

Неопределенность

Неопределенность измерений – ключевое понятие. Зачастую необходима информация о диапазоне, в котором находится истинное значение измеряемой величины. Например, после проведения измерений можно с вероятностью 99 % утверждать, что истинная концентрация целевого компонента в пищевом продукте находится между 21,52 и 23,65 мг/кг.

Предполагается, что для любого вида измерений существует некоторая неопределенность генеральной совокупности.

Источники неопределенности

Неопределенность обусловлена двумя основными видами факторов. Первая группа факторов связана с правилами отбора образцов. Например, для определения количества пищевой добавки в продукте, но поскольку добавка распределена в массе продукта неравномерно, образцы могут несколько различаться по составу. Кроме того, производственный процесс не всегда обеспечивает идентичность состава продукта. Это особенно важно в случае изменчивости состава исходного сырья, например, в зависимости от времени года, особенности возделывания, графических факторов, генетики и даже от времени суток сбора урожая.

Вторая группа факторов обусловлена ошибкой анализа, в том числе ошибкой измерений. Большинство измерений включает несколько аналитических операций, например, экстрагирование, взвешивание, разбавление и регистрацию инструментального отклика. Каждый этап аналитического цикла вносит свой вклад в общую неопределенность. Если для измерения объема пробы используется мерная колба на 100 мл, ее фактический

объем никогда не будет точно 100 мл. Из двух мерных колб одна может иметь объем 99,93 мл, а другая – 100,21 мл. Кроме того, объемы проб будут зависеть от температуры, а также квалификации лаборанта. Таким образом, полученные значения измеряемого объема проб образуют некоторое распределение, и чем шире это распределение, тем больше значение неопределенности.

Ошибки

Относительная значимость ошибки аналитических измерений зависит от того, в каком ракурсе рассматривается вопрос, на который необходимо получить ответ. В некоторых случаях основной целью анализа является определение содержания целевого компонента в определенной партии продукта или в отдельно взятой пробе, отобранной из конкретного образца. В другом случае требуется, например, определить количество танина в чае определенной торговой марки. Чем больше объем выборки, тем больше неопределенность.

Результат измерений концентрации (c) целевого вещества и его истинное значение (\tilde{c}) связаны уравнением 2.1

$$c = \tilde{c} + e_{\text{изм}} + e_{\text{проб}} + e_{\text{калиб}}, \quad (2.1)$$

где e -члены называются «слагаемыми ошибок».

Необходимо отметить, что смысл ошибок измерения и неопределенности измерения различен. Предположим, например, что истинная концентрация вещества в пищевом продукте составляет 1,73 мг/л. При проведении аналитических измерений в образце продукта установлена концентрация вещества 1,68 мг/л, при этом ошибка составила 0,05 мг/л. Однако неопределенность измерения может составлять 0,08 мг/л. Это справедливо в том случае, если одно из полученных значений измеряемой величины отличается на 0,05 мг/л от среднего значения, а для другого значения эта разница составляет 0,13 мг/л вследствие неомогенности образца.

Каждое из слагаемых ошибок измерения и выборки образует распределение и возникает из нескольких различных источников. На практике слагаемые ошибки представляют собой сумму нескольких отдельных распределений. Однако существует центральная предельная теорема, согласно которой «сумма достаточно большого количества величин, имеющих примерно одинаковые масштабы, имеет распределение, близкое к нормальному», которое характеризуется средним значением и стандартным отклонением. Чем больше значение стандартного отклонения, тем больше значение неопределенности.

2.2 Определение неопределенности

Чтобы определить неопределенность, сначала необходимо выделить факторы, которые влияют на значение неопределенности. Например, необходимо ли изучить изменчивость нескольких образцов или одиночного образца? Используется ли для измерений один набор лабораторной посуды и приборов? Выполняются измерения одним или несколькими лаборантами? Для аккредитованных независимых лабораторий, осуществляющих контроль качества продукции, эти факторы определяют заранее, а такие организации, как

Международный союз теоретической и прикладной химии (*International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC*), Европейская сеть организаций по аналитической химии (ЕвроХим, *Eurachem*), Национальный институт стандартов и технологии (*National Institute of Standards and Technology*) предоставляют соответствующие руководства и методики для проведения испытаний.

После определения влияния на неопределенность факторов и их уровень обычно проводят многофакторный эксперимент. При этом, как правило, используется некоторый вид планирования эксперимента, чтобы гарантировать отсутствие смещения результатов повторных измерений. Например, если в проведении анализа участвуют четыре лаборанта и используют два прибора, они проводят 24 измерения, при этом каждый лаборант должен выполнить шесть измерений, по три на каждом приборе. Таким образом, чем больше влияющих факторов, тем сложнее план эксперимента.

Чтобы получить приемлемое значение стандартного отклонения измерений, требуется достаточное количество повторных измерений. Если, например, выполняется 100 повторных измерений, а истинное стандартное отклонение генеральной совокупности составляет 0,136 мг/кг, то с большой вероятностью получают хорошую оценку стандартного отклонения. Если повторных измерений всего лишь пять, значение стандартного отклонения может иметь высокое значение. Важно понимать, что для определения неопределенности с заданным уровнем достоверности требуется большое количество повторных измерений. Существуют методы, позволяющие преодолеть эту проблему, но они достаточно сложные, поэтому удобнее всего просто использовать большое количество повторений.

2.3 Неопределенность выборки

Важным источником неопределенности является выборка, которая, однако, зачастую рассматривается отдельно от аналитической неопределенности. Такое разделение бывает связано с организационными особенностями; например, одни сотрудники лаборатории могут отвечать за проведение анализа, используя для этого инструментальные методы, а другие – за полевой сбор образцов.

Вычисление неопределенности

Процедура вычисления неопределенности включает ряд этапов, обычно вычисляют стандартное отклонение измерений (формула 2.2), полученных при повторении этапа j :

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (c_i - \bar{c})^2}{I - 1}}, \quad (2.2)$$

c_i – i -значение измеряемой концентрации; \bar{c} – ее среднее значение; I – количество повторных измерений на этапе j .

Стандартное отклонение иногда называют прецизионностью. Такой этап может быть на любой стадии аналитического цикла, включая взвешивание, разбавление, запись спектров или отбора проб образцов. Это значение является экспериментальной оценкой прецизионности (u_j) каждого этапа.

Общая прецизионность вычисляется по формуле 2.3

$$u = \sqrt{\sum_{j=1}^J u_j^2}. \quad (2.3)$$

Для некоторых операций аналитического цикла, например, калибровки, не всегда можно оценить значение прецизионности путем репликации, однако в качестве альтернативы можно использовать среднеквадратические ошибки калибровки.

Отдельные неопределенности обычно выражают в процентах: неопределенность для мерной колбы может быть 2 %, для весов 1 %, для процедуры экстрагирования 5 % и т.д., следовательно, если имеется пять факторов с неопределенностью 8, 1, 3, 11 и 4 %, то

$$u = \sqrt{0,08^2 + 0,01^2 + 0,03^2 + 0,11^2 + 0,04^2} = 0,145 \text{ или } 14,5 \%$$

Если истинная концентрация вещества в пищевом продукте составляет 32,61 мг/кг, то неопределенность 14,5 % соответствует 4,74 мг/кг. Отметим, что если пренебречь двумя наименьшими источниками неопределенности (1 и 3 %), то общая неопределенность изменяется лишь в пределах 0,3-14,2 %. Это означает, что можно пренебречь этими источниками и получить удовлетворительные ответы, используя повторные измерения только в трех из этих пяти факторов.

Иногда нет необходимости определять все неопределенности экспериментально, поскольку эта информация обычно указана производителями посуды и лабораторного оборудования или имеется в виде стандартных справочных данных. Например, технические условия гарантируют, что предельное отклонение объема 95 % 100-миллилитровых мерных колб от данного производителя составляет 0,6 мл. Это означает, что объем 95 % колб находится между 99,4 мл и 100,6 мл. Для преобразования таких данных в неопределенность обычно используют нормальное распределение, согласно которому ожидается, что 95 % всех измерений находится в пределах 1,96 стандартного отклонения от среднего. Таким образом, 0,6 мл должно быть эквивалентно 1,96 умноженному на неопределенность, то есть $u = 0,6/1,96 = 0,306$ мл, представляя одно стандартное отклонение.

Иногда производители указывают интервал: например, пипетка на 5 мл может иметь минимальный объем 4,92 мл, а максимальный – 5,08 мл. Обычно величину этого интервала делят на 3, получая оценку стандартного отклонения, а затем вычисляют неопределенность обычным способом.

Чтобы эти вычисления имели практический смысл, во всех случаях должен использоваться один и тот же метод анализа, набор посуды и лабораторного оборудования, например, одни и те же весы, мерные колбы, мензурки и приборы. Это не всегда возможно, особенно если значения концентраций веществ в образцах существенно варьируются. В этом случае для получения сопоставимых результатов может потребоваться концентрирование или разбавление образцов.

В качестве альтернативы можно вычислить неопределенности, соответствующие различным уровням концентрации вещества в образцах, поскольку для измерения концентраций в областях значений 1, 10 или 100 мг/кг могут использоваться разные аналитические процедуры.

Известно, что ошибка измерений является гетероскедастичекой, если зависит от концентрации анализируемого вещества или интенсивности спектральных пиков, для вычисления неопределенности можно использовать существующие способы модификации основных уравнений. В некоторых случаях оборудование для проведения аналитических операций остается таким же, поэтому не зависит от анализируемых веществ. В такой ситуации уравнение вычисления неопределенности (уравнение 2.4) можно модифицировать, придавая вес c_j каждой частной неопределенности:

$$u = \sqrt{\sum_{j=1}^J c_j \cdot u_j^2}. \quad (2.4)$$

Документирование неопределенности

Неопределенность можно документировать различными способами, простейший способ – объявить, что неопределенность партий мерных колб объемом 5 мл составляет 0,32 мл: это подразумевает, что стандартное отклонение их объемов равно 0,32 мл.

Чаще всего при этом указывают достоверный интервал, например, запись об оценке концентрации вещества может быть представлена в виде $(86,69 \pm 3,27)$ мг/кг. Рекомендуется, чтобы число 3,27 было удвоенным стандартным отклонением ошибок или удвоенной неопределенностью. Оно свидетельствует о том, что коэффициент охвата равен 2, и тем самым указывает конечный результат в виде $(c \pm 2u)$. Это соответствует приблизительно 95 %-ной достоверности анализа, если образцы имеют нормальное распределение, при этом попадать в этот интервал должны 19 из 20 измерений.

2.4 Точность и смещение

Определение

Точность означает близость результата к его истинному значению. Например, если истинная концентрация вещества в пробе составляет 103,24 мг/кг, а средняя измеряемая концентрация – 105,61 мг/кг, то неточность процесса измерения будет равна 2,37 мг/кг. Чем ближе измеренная

концентрация (обычно это среднее значение нескольких единичных измерений) к ее истинному значению, тем она точнее. Точность отличается от прецизионности или неопределенности тем, что последняя отражает разброс результатов, тогда как первая показывает, насколько хорошо результат согласуется с его истинным значением.

Иногда процесс измерения может быть прецизионным, но не точным. Например, если весы плохо откалиброваны, то результаты повторных измерений могут оказаться очень близкими, но на самом деле все они содержат некоторую постоянную ошибку. Этот тип ошибки часто называют «смещением».

Оценка точности

Точность зачастую труднее оценить, чем прецизионность или неопределенность, поскольку это трудно сделать путем анализа повторных измерений.

Для оценки точности измерений имеется два способа. Первый основывается на использовании сертифицированного эталонного материала, свойства которого хорошо определяются. Такие стандарты представляются национальными и международными организациями. Второй способ заключается в проведении межлабораторных исследований, когда анализируемый материал отправляют в несколько лабораторий (или нескольким аналитикам в одной лаборатории, или используют несколько инструментов, если есть подозрение на внутреннее лабораторное смещение) и сравнивают полученные результаты.

Во всех случаях рекомендуется несколько повторных измерений на одном материале, чтобы в каждом случае получают среднее значение и стандартное отклонение измеряемой величины.

Значимость различия средних

Основной статистический метод должен дать ответ на вопрос, отличается ли среднее измерение, полученное из одного источника (например, s_A из лаборатории A) от среднего измерения, полученного из другого источника (например, s_B из лаборатории B). Для этого сравнивают разницу между средними из обоих источников с их стандартными отклонениями. Если средние измерения отличаются друг от друга на несколько стандартных отклонений, то разница средних значительна, и можно утверждать, что одна из процедур смещена относительно другой.

Для этого сначала вычисляют объединенное стандартное отклонение двух процедур (уравнение 2.5):

$$s = \sqrt{\frac{(I_A - 1)S_A^2 + (I_B - 1)S_B^2}{I_A + I_B + 2}}, \quad (2.5)$$

S_A – стандартное отклонение, полученное для процедуры или лаборатории А; I_A – соответствующее количество образцов. То есть происходит усреднение стандартных отклонений этих процедур.

Затем для сравнения средних значений вычисляют значение t-критерий (критерий Стьюдента) по уравнению 2.6:

$$t = \frac{\bar{c}_A - \bar{c}_B}{s \sqrt{\frac{1}{I_A} + \frac{1}{I_B}}}, \quad (2.6)$$

который обычно представлен в статистических таблицах положительным числом, поэтому предполагается, что процедура А дает более высокую оценку средней концентрации. Чем больше значение t-критерия, тем больше вероятность, что две процедуры отличаются. В литературе имеется несколько определений t-критерия, а приведенное выше относится к рассматриваемой ситуации.

Контрольные вопросы

1. Какие существуют способы использования статистических методов в количественном анализе пищевых продуктов?
2. Какие источники неопределенности существуют при анализе пищевых продуктов?
3. Дайте определение понятию «ошибка».
4. Каким образом происходит вычисление неопределенности?
5. Объясните, почему процесс измерения может быть прецизионным, то не точным.
6. Что характеризует критерий Стьюдента?

3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ

Относительная плотность представляет собой отношение плотности исследуемого вещества к плотности «стандартного» вещества, измеряемое при определенных физических условиях (формула 3.1):

$$d = \frac{\rho}{\rho_0}, \quad (3.1)$$

где ρ – плотность исследуемого вещества ($\text{кг}/\text{м}^3$); ρ_0 – плотность «стандартного» вещества ($\text{кг}/\text{м}^3$).

Плотность вещества, ρ , $\text{кг}/\text{м}^3$, может быть определена как отношение покоящейся массы, m (кг), к ее объему v (м^3). Вычисление плотности проводят по уравнению 3.2:

$$\rho = \frac{m}{v}. \quad (3.2)$$

В качестве стандарта для жидких веществ, в том числе и пищевых продуктов, используют чистую воду при температуре $3,98\text{ }^\circ\text{C}$ и нормальном атмосферном давлении, так как данные условия соответствует наибольшей ее плотности [4].

Относительная плотность может быть определена при температуре продукта $20\text{ }^\circ\text{C}$ и воды $4\text{ }^\circ\text{C}$ или $20\text{ }^\circ\text{C}$. Это условно обозначается символами $d_{4^\circ\text{C}}^{20^\circ\text{C}}$ или $d_{20^\circ\text{C}}^{20^\circ\text{C}}$. Пересчет значений плотности $d_{4^\circ\text{C}}^{20^\circ\text{C}}$ в $d_{20^\circ\text{C}}^{20^\circ\text{C}}$ и наоборот осуществляется с использованием температурных коэффициентов расширения.

$$d_{20^\circ\text{C}}^{20^\circ\text{C}} = 1,00177 \cdot d_{4^\circ\text{C}}^{20^\circ\text{C}} \text{ и } d_{4^\circ\text{C}}^{20^\circ\text{C}} = 0,99823 \cdot d_{20^\circ\text{C}}^{20^\circ\text{C}}$$

Относительная плотность жидких продуктов зависит также от концентрации сухих веществ в них.

Определение показателя плотности важно при оценке качества молока, изучении содержания сухих веществ в плодовых и ягодных напитках и экстрактах, содержания поваренной соли в растворах.

На практике относительная плотность определяется с применением пикнометрических или ареометрических методов.

В основе пикнометрического метода лежит определение массы равных объемов исследуемого продукта и воды при температуре $20\text{ }^\circ\text{C}$. Для этих целей используют прибор пикнометр, который предварительно взвешивается, а затем термостатируется вместе с исследуемым продуктом и отдельно с дистиллированной водой.

По полученным данным можно вычислить плотность исследуемого продукта, используя формулу 3.3

$$d_{20} = \frac{m_1 - m}{m_2 - m}, \quad (3.3)$$

где m – масса пустого пикнометра, г; m_1 – масса пикнометра с исследуемой жидкостью, г; m_2 – масса пикнометра с дистиллированной водой, г.

Измерение относительной плотности ареометрическим методом осуществляют на приборе ареометр. Ареометр погружается в исследуемый жидкий продукт до тех пор, пока масса жидкого продукта, вытесненного им, не станет равной массе ареометра. Плотность продукта при этом определяют по градуированной шкале ареометра, которая находится в зависимости от уровня его погружения. Некоторые ареометры имеют термометр, что позволяет измерять температуру исследуемого жидкого продукта.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию «относительная плотность».
2. Какое вещество является стандартом при определении значения относительной плотности пищевых продуктов?
3. Дайте характеристику методу определения плотности пищевых продуктов.

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОСТИ

Кислотность пищевых продуктов напрямую связана с показателями качества продовольственного сырья и готовых изделий на всех этапах производства. Этот показатель нормируется и является обязательным при изучении физико-химических показателей молока и молочных продуктов, булочных изделий, фруктовых и овощных соков, и др. Кислотность также дает представление о степени их свежести. Выделяют общую и активную кислотность [4].

Общая кислотность дает представление о содержании в продукте всех кислот и их кислых солей, которые способны вступать в реакцию со щелочью при титровании.

В основу метода определения титруемой кислотности лежит нейтрализация кислот, которые содержатся в исследуемом объекте, раствором щелочи в присутствии индикатора. Титруемую кислотность может быть выражена в градусах Тернера ($^{\circ}\text{T}$) или градусах Кеттстофера ($^{\circ}\text{K}$), а также в процентах какой-либо кислоты, что зависит от анализируемого продукта.

Один градус Тернера соответствует объему (см^3) водного раствора гидроксида натрия концентрацией $0,1$ моль/ дм^3 , необходимый для нейтрализации 100 г (100 см^3) исследуемого продукта [4].

Для определения общей кислотности готовят вытяжку из исследуемого образца, к ней добавляют индикатор, который зависит от цвета исследуемого образца (1 %-ый фенолфталеин можно использовать для продуктов, чья окраска отлична от красного цвета, например, для молока; использование для фруктовых и ягодных соков и морсов может быть затруднено, так как визуальное изменение цвета будет трудноуловимо), и титруют $0,1$ моль/ дм^3 раствором щелочи до изменения окраски индикатора, не исчезающего (при спокойном стоянии пробы) 1 мин. По объему раствора щелочи, пошедшего на титрование, рассчитывают титруемую кислотность, используя формулу для данного конкретного вида продукта.

Активная кислотность используется для определения показателя качества некоторых видов продукции и сырья, таких как бульоны, мясные полуфабрикаты и др. Определение проводят электрометрически на рН-метрах разных марок. Данные приборы включают в себя стеклянный и вспомогательный электрод, которые погружают в раствор анализируемого образца, в следствии чего происходит обмен ионами между поверхностью стеклянного электрода и раствора. Это приводит к тому, что ионы лития в поверхностных слоях стекла замещаются ионами водорода, и стеклянный электрод приобретает свойства водородного электрода. Значение рН исследуемых образцов определяют по шкале прибора.

Контрольные вопросы

1. В чем различия титруемой и активной кислотности?
2. Какие методы определения кислотности существуют?

5 АНАЛИЗ БЕЛКОВ, ПЕПТИДОВ И АМИНОКИСЛОТ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Белки, или протеины (от греч. *πρωτος* – первый, важнейший), представляют собой высокомолекулярные природные полимеры, состоящие из остатков α-аминокислот. Их молекулярная масса может варьироваться от 5-10 тыс. до 1 млн. и более. Аминокислоты в белковых молекулах связаны пептидными связями в последовательную цепь [18].

Функциональные свойства белков в пищевых продуктах обусловлены их структурными и другими физико-химическими свойствами [15].

На элементарном уровне белок содержит (по массе) 50-55 % углерода, 20-23 % кислорода, 12-19 % азота (в среднем 16 %), 6-7 % водорода, 0,2-3,0 % серы и 0,5-0,6 % фосфора.

5.1 Нутритивные свойства белка

Белки обладают разной биологической ценностью, и эти различия обусловлены такими факторами, как содержание незаменимых (эссенциальных) аминокислот и усвояемость. Следовательно, суточная норма потребления белка зависит от типа и состава белков в рационе.

5.1.1 Качество белка

Характеристика «качество белка» относится, главным образом, к содержанию в них эссенциальных аминокислот и усвояемости данного белка. Высококачественные белки – это белки, содержащие все эссенциальные аминокислоты в количестве, превышающем эталонный уровень, установленный Организацией ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства (ФАО), Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и Университетом ООН (УООН), усвояемость которых сопоставима или выше усвояемости яичного или молочного белков. С учетом этого «качество» белков животного происхождения выше, чем растительных белков.

Белки большинства зерновых и бобовых культур зачастую лимитированы, по крайней мере, одной из эссенциальных аминокислот. Если белки таких зерновых культур, как рис, пшеница, ячмень и кукуруза, богаты метионином и содержат очень мало лизина, то в семенах бобовых растений и масличных культур, напротив, содержится недостаточно метионина, но зато они богаты лизином или содержат его в достаточном количестве, однако в белках арахиса мало и метионина, и лизина. Эссенциальные аминокислоты, содержание которых в тех или иных белках ниже, чем в эталонном белке, называют лимитирующими. Взрослые, потребляющие только белки злаковых или бобовых культур, испытывают проблемы со здоровьем, а у детей младше 12 лет, потребляющих с пищей только белки из этих источников, снижается скорость роста. Содержание эссенциальных аминокислот в различных пищевых белках приведено в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Содержание эссенциальных аминокислот, мг/г белка и биологическая ценность различных пищевых белков

Аминокислота и биологическая ценность	Источник белка												
	Яичный белок	Коровье молоко	Говядина	Рыба	Пшеница	Рис	Кукуруза	Ячмень	Соевые бобы	Кормовой горох, вареный	Зеленый горошек	Арахис	Фасоль обыкновенная
Гистидин	22	27	34	35	21	21	27	20	30	26	26	27	30
Изолейцин	54	47	48	48	34	40	34	35	51	41	41	40	45
Лейцин	86	95	81	77	69	77	127	67	82	71	70	74	78
Лизин	70	78	89	91	23	34	25	32	68	63	71	39	65
Метионин + цистеин	57	33	40	40	36	49	41	37	33	22	24	32	26
Фенилаланин +тирозин	93	102	80	76	77	94	85	79	95	69	76	100	83
Треонин	47	44	46	46	28	34	32	29	41	33	36	29	40
Триптофан	17	14	12	11	10	11	6	11	14	8	9	11	11
Валин	66	64	50	61	38	54	45	46	52	46	41	48	52
Общее содержание эссенциальных аминокислот	512	504	480	485	336	414	422	356	466	379	394	400	430
Содержание белка, %	12	3,5	18	19	12	7,5	-	-	40	32	28	30	30
Химическая оценка, % (по данным ФАО/ВОЗ, норма 1985 г.)	100	100	100	100	40	59	43	55	100	73	82	67	-
<i>PER</i>	3,9	3,1	3,0	3,5	1,5	2,0	-	-	2,3	-	2,65	-	-
<i>BV</i> (на крысах)	94	84	74	76	65	73	-	-	73	-	-	-	-
<i>NPU</i>	94	82	67	79	40	70	-	-	61	-	-	-	1

PER, Protein efficiency ratio – коэффициент эффективного белка; *BV*, Biological value – показатель биологической ценности; *NPR*, Net protein ratio – чистой эффективности белка

В белках как животного, так и растительного происхождения, как правило, содержится достаточное или избыточное количество гистидина, лейцина, изолейцина, фенилаланина и тирозина, а также валина. Эти аминокислоты в пищевых продуктах обычно не являются лимитирующими, к которым чаще всего относятся лизин, треонин, триптофан и серосодержащие аминокислоты. Биологическую ценность белка, в котором наблюдается дефицит незаменимых аминокислот, можно исправить путем его сочетания с другими белками, в которых их больше. Так, сочетание белков зерновых и бобовых культур обеспечивает полный и сбалансированный уровень незаменимых аминокислот, то есть рацион, состоящий из соответствующего количества зерновых и бобовых, как правило, достаточен для обеспечения роста и жизнедеятельности организма. Биологическую ценность белков низкого «качества» можно повысить путем обогащения их свободными незаменимыми аминокислотами, содержание которых в данном белке недостаточно. Например, обогащение (сапплементация) бобовых метионином, а злаковых культур – лизином обычно повышает их нутритивное качество.

Биологическая ценность белков или их смеси идеальна в том случае, когда в них содержатся все эссенциальные аминокислоты, причем в таком соотношении, которое обеспечивает оптимальные жизнедеятельность и темпы роста (табл. 5.2). Тем не менее, так как реальная потребность в незаменимых аминокислотах для каждого человека в данной группе населения зависит от его пищевого и физиологического статуса, в качестве безопасного уровня для всех возрастных групп рекомендуется придерживаться норм относительно эссенциальных аминокислот для детей дошкольного возраста (от 2 до 5 лет).

Таблица 5.2

Рекомендованные нормы потребления эссенциальных аминокислот с пищевыми белками

Аминокислота	Рекомендуемая норма, мг/г белка			
	Дети в возрасте до 2 лет	Дети в возрасте от 2 до 5 лет	Дети в возрасте 10-12 лет	Взрослые
Гистидин	26	19	19	16
Изолейцин	46	28	28	13
Лейцин	93	66	44	19
Лизин	66	58	44	16
Метионин + цистеин	42	25	22	17
Фенилаланин + тирозин	72	63	22	19
Треонин	43	34	28	9
Триптофан	17	11	9	5
Валин	55	35	25	13
<i>Всего</i>	434	320	222	111

Избыточное потребление какой-то аминокислоты может привести к «антагонизму аминокислот» и пищевому отравлению. Чрезмерное потребление аминокислот зачастую приводит в результате к увеличению потребности в других эссенциальных аминокислотах (вследствие конкуренции аминокислот за участки всасывания в кишечнике). Так, повышенное содержание лейцина снижает всасывание изолейцина, валина и тирозина, даже если в рационе эти аминокислоты присутствуют в достаточном количестве, что приводит к увеличению потребности организма в этих трех аминокислотах. Избыточное потребление других аминокислот может также замедлять развитие и приводить к развитию тех или иных патологий.

5.1.2 Усвояемость

Хотя содержание эссенциальных аминокислот является основным показателем качества белка, истинное его качество зависит также от степени усвояемости данного белка организмом, то есть и от усвояемости и биологической ценности аминокислот. Усвояемость различных белков приведена в табл. 5.3. Пищевые белки животного происхождения усваиваются лучше, чем растительного.

Таблица 5.3

Усвояемость различных пищевых белков человеком

Источник белка	Усвояемость, %	Источник белка	Усвояемость, %
Яйцо	97	Просо	79
Молоко, сыр	95	Зеленый горошек	88
Мясо, рыба	94	Арахис	94
Кукуруза	85	Соевая мука	86
Рис (шлифованный)	88	Изолят соевого белка	95
Пшеница цельнозерная	86	Фасоль	78
Пшеничная мука высшего или первого сорта	96	Кукуруза (зерно)	70
Пшеничный глютен (клейковина)	99	Пшеница (зерно)	77
Овсяные хлопья	86	Рис (зерно)	75

Усвояемость белков зависит от нескольких факторов, которые мы рассмотрим далее.

5.1.2.1 Конформация белка

Гидролиз белков протеазами зависит от структурного состояния белка. Нативные белки, как правило, гидролизированы меньше, чем частично денатурированные. Например, обработка фазеолина (белка фасоли) смесью протеаз обуславливает лишь частичное расщепление белка, высвобождая в основном полипептиды с молекулярной массой 22 000 Да. Если денатурированный в ходе тепловой обработки фазеолин подвергнуть расщеплению в тех же условиях, то он полностью гидролизуется до аминокислот и дипептидов. Как правило, нерастворимые фибриллярные и полностью денатурированные глобулярные белки с трудом гидролизуются.

5.1.2.2 Факторы, снижающие биологическую ценность (антипитательные)

Большинство изолятов и концентратов растительного белка содержат ингибиторы трипсина и химотрипсина (типа Кунитца и типа Баумана-Бирка), а также лектины. Эти ингибиторы препятствуют полному гидролизу белков из бобовых и масличных культур панкреатическими протеазами. Лектины, представляющие собой гликопротеины, связываются с клетками слизистой кишечника и препятствуют всасыванию аминокислот. Лектины и ингибиторы протеаз типа Кунитца термолабильны, тогда как ингибиторы типа Баумана-Бирка термостойки. Таким образом, белки бобовых и масличных культур после тепловой обработки лучше усваиваются, чем изоляты нативных белков (несмотря на некоторое остаточное содержание в них ингибитора типа Баумана-Бирка). Растительные белки содержат и другие вещества, снижающие биологическую ценность, а именно танины и фитаты. Танины, являющиеся продуктами конденсации полифенолов, ковалентно связываются с ϵ -аминогруппами остатков лизина, что препятствует катализируемому трипсином расщеплению полипептидов на сайтах связывания лизина.

5.1.2.3 Промышленная переработка

Скорость и полноту гидролиза снижает также взаимодействие белков с полисахаридами и пищевыми волокнами, что важно при экструзии пищевых продуктов в условиях высоких температур и давления. Вследствие подверженности остатков лизина воздействию высоких температур и щелочного диапазона pH белки претерпевают некоторую химическую перестройку, снижающую их усвояемость. Усвояемость лизина снижается также из-за реакции редуцирующих сахаров с ϵ -аминогруппами.

5.1.3 Оценка биологической ценности белков

Поскольку биологическая ценность белков может значительно различаться и зависит от многих факторов, очень важно пользоваться проверенными методами

определения их качества. Оценка качества белка позволяет определить его количество, необходимое для обеспечения безопасного уровня потребления эссенциальных аминокислот для поддержания жизнедеятельности и темпов развития организма, а также контролировать изменение биологической ценности белков при переработке пищевых продуктов в целях подбора таких технологических режимов, при которых качество белка снижается в минимальной степени. Биологическую ценность белков можно оценивать различными биологическими, химическими и ферментативными методами.

5.1.3.1 Биологические методы

Биологические методы основаны на анализе темпов прироста массы тела или ретенции азота подопытными животными, получающими белковый корм, по сравнению с контрольной группой, получающей безбелковый корм. Для оценки качества белка, как правило, используется протокол ФАО/ВОЗ [20]. Обычно подопытными животными служат крысы, но иногда применяют и испытания на людях. Для подтверждения того, что количество потребляемого белка ниже суточной нормы, используют рацион с содержанием белка около 10 % (по сухой массе), причем энергетическая ценность данного рациона обеспечивается. В этих условиях пищевые белки усваиваются в максимальной для развития организма степени. Количество подопытных животных должно быть достаточным для получения достоверных статистических результатов. Как правило, эксперимент длится 9 сут, и ежедневно в таблицу заносят количество потребленной каждым животным пищи (в граммах), а для анализа на азот собирают экскременты и мочу.

Полученные данные затем используют для расчета качества белка несколькими способами. Коэффициент эффективного белка (*PER*) определяют как прибавку массы тела (в граммах) на 1 г потребленного белка. Применяют и другой показатель – коэффициент чистой эффективности белка (*NPR*, *Net protein ratio*), который рассчитывают по следующей формуле 5.1:

$$NPR = \frac{\text{(увеличение массы тела)} - \text{(потеря массы тела у безбелковой группы)}}{\text{количество усвоенного белка}}. \quad (5.1)$$

Данные по *NPR* дают информацию о способности белка к поддержанию жизнедеятельности и роста. Поскольку крысы растут гораздо быстрее, чем человек, а для развития ребенка требуется больший процент белка, чем для крыс, встает вопрос о применимости для человека значений *PER* и *NPR*, полученных в опытах на крысах. Несмотря на обоснованность данного аргумента, разработана соответствующая процедура корректировки результатов.

Еще один подход к оценке качества белка основан на расчете потребления и потерь азота. С его помощью можно рассчитать два важных параметра качества белка. Кажущаяся усвояемость белка (или коэффициент усвоения белка)

рассчитывают по разнице между количеством усвоенного азота и его количеством в фекалиях, однако поскольку общее количество азота в фекалиях включает метаболический или эндогенный азот, для получения истинной усвояемости белка (ИУ, TD) необходимо ввести поправку по формуле 5.2:

$$TD = \frac{I - (F_N - F_{k,N})}{I} \cdot 100, \quad (5.2)$$

где I – количество усвоенного азота; F_N – общее количество азота в фекалиях; $F_{k,N}$ – эндогенный азот в фекалиях. Значение $F_{k,N}$ рассчитывают по безбелковому рациону.

Показатель ИУ (TD) дает информацию о проценте всасываемого азота в организме, но никак не свидетельствует о том, какое количество этого всасываемого азота фактически удержано или утилизировано организмом.

Показатель биологической ценности (BV) рассчитывают по формуле 5.3

$$BV = \frac{I - (F_N - F_{k,N}) - (U_N - U_{k,N})}{I - (F_N - F_{k,N})} \cdot 100, \quad (5.3)$$

где U_N и $U_{k,N}$ – это соответственно потери общего и эндогенного азота с мочой.

Таким образом, показатель NPU (чистой утилизации белка) определяется как процентное отношение поглощенного и удержанного в организме азота. Рассчитывают его как произведение TD на BV , то есть по формуле 5.4,

$$NPU = TD \cdot BV = \frac{I - (F_N - F_{k,N}) - (U_N - U_{k,N})}{I} \cdot 100. \quad (5.4)$$

Значения показателей PER , BV и NPU для различных пищевых продуктов приведены выше в табл. 5.1.

К другим биопробам, иногда применяющимся для оценки качества белка, относятся биопробы на ферментативную активность, на изменение содержания эссенциальных аминокислот в плазме крови, на содержание мочевины в плазме крови и моче, на скорость насыщения плазмы крови белками, а также на темпы увеличения массы тела подопытных животных, получавших ранее безбелковый корм.

5.1.3.2 Химические методы

Биологические методы очень дороги и требуют значительного времени. Быстро оценить биологическую ценность белков можно путем определения содержания в них аминокислот и сопоставления полученных данных с идеальной комбинацией эссенциальных аминокислот. Идеальная комбинация эссенциальных аминокислот белков (по эталонному белку) для детей в возрасте от 2 до 5 лет приведена выше в табл. 5.2 [5]. Она используется в качестве стандарта для всех возрастных групп, за исключением новорожденных. Каждой эссенциальной аминокислоте в анализируемом белке дается химическая оценка

(скор), которую получают по следующей формуле 5.5:

$$\frac{\text{Содержание аминокислоты, } \frac{\text{МГ}}{\text{Г}} \text{ испытываемого белка}}{\text{Содержание той же аминокислоты, } \frac{\text{МГ}}{\text{Г}} \text{ эталонного белка}} \cdot 100. \quad (5.5)$$

Эссенциальные аминокислоты с минимальным химическим скором являются наиболее лимитирующими аминокислотами данного белка. Химический скор данной лимитирующими аминокислотами пищевых белков являются лизин, тирозин, триптофан и серосодержащие аминокислоты, так что для оценки биологической ценности белка достаточно знать химический скор этих аминокислот. Он позволяет рассчитать, какое количество анализируемого белка или смеси белков обеспечивает требуемое суточное потребление лимитирующих аминокислот. Расчет проводят по формуле 5.6

$$A = \frac{\text{Рекомендуемое потребление яичного или молочного белка}}{\text{Химический скор белка}} \cdot 100, \quad (5.6)$$

где А – требуемое потребление белка

Одним из преимуществ этого метода является его простота, а также то, что он позволяет определить комплементарные эффекты белков в рационе. Кроме того, с его помощью можно составлять рационы с высококачественными белками путем комбинирования различных белков для разных диетических программ. Вместе с тем у данного метода есть и некоторые недостатки. В его основе лежит допущение, что все анализируемые белки усваиваются полностью и одинаково, то есть все эссенциальные аминокислоты всасываются полностью. Поскольку это допущение зачастую не выполняется, не удастся получить хорошую корреляцию результатов с результатами, полученными биологическими методами (ее можно повысить, если в расчетах химического сора учитывать усвояемость белка). Кажущуюся усвояемость белка можно быстро определить *in vitro* при использовании комбинации трех-четырёх ферментов (например, трипсина, химотрипсина, пептидазы и бактериальной протеазы).

Еще одним недостатком метода химического сора является то, что в нем не учитывается различие *D*- и *L*-аминокислот. Так как животными усваиваются только *L*-аминокислоты, метод химического сора дает завышенную оценку биологической ценности белкой (особенно в условиях высоких значений рН, обуславливающих рацемизацию). С помощью химического сора нельзя также спрогнозировать негативные влияния высокой концентрации одной из аминокислот на биодоступность других эссенциальных аминокислот, а также эффект таких «антиалиментарных» факторов, как действие ингибиторов протеаз и лектинов, которые могут присутствовать в рационе. Несмотря на эти недостатки, последние полученные данные свидетельствуют, что химический скор белков с коррекцией на усвояемость хорошо коррелируют с данным

биологической оценки белков, у которых показатель *BV* выше 40 % (если он ниже, то корреляция плохая) [5].

5.1.3.3 Ферментативные и микробиологические методы

Для определения усвояемости и высвобождения эссенциальных аминокислот применяются ферментативные методы *in vitro*. По одному из таких методов испытываемый белок сначала расщепляют пепсином, а затем панкреатином (сухим экстрактом панкреатина сублимационной сушки). По другому методу белки в стандартных условиях анализа разлагаются тремя ферментами – трипсином поджелудочной железы, химотрипсином и свиной кишечной пептидазой. Помимо информации об усвояемости белков, эти методы полезны для выявления изменения в качестве белков в ходе промышленной переработки.

Для определения биологической ценности белков применяют также микробиологические методы, в частности анализ роста и размножения некоторых микроорганизмов (*Streptococcus zymogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Clostridium perfringens*) и простейших (*Tetrahymena pyriformis*). Особенно полезны *T. pyriformis*, поскольку их потребность в аминокислотах сходна с потребностями крыс и человека.

5.2 Анализ белков, пептидов и аминокислот: основные рекомендации

Для предотвращения биохимических изменений белков и пептидов образцы пищевых продуктов для лабораторного анализа необходимо отбирать как можно быстрее и хранить без доступа кислорода при низкой температуре (0-4 °С). Если белки извлекают из пробы для последующего фракционирования (электрофорез или хроматографии), образцы необходимо поместить в изолирующие среды с веществами, предотвращающие развитие микробиоты (например, с добавлением 0,1 мМ азидата натрия), защищающими белки от образования хелатных комплексов с металлами (например, с добавлением 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты – ЭДТА) и предотвращающими протеолиз белков (например, с добавлением 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторида, действующего как ингибитор серинпротеазы).

5.2.1 Извлечение и очистка белков

Извлечение белков из пищевых систем сводится к отделению белков от матрикса в гомогенной форме или в виде фракции белков, пригодной для проведения дальнейших анализов. На первой стадии обычно извлекают водорастворимые белки. Для этого животные или растительные ткани необходимо дезинтегрировать гомогенизацией или осмолизом. Гомогенизацию осуществляют в высокоскоростных блендерах (10000-15000 об/мин) с острыми ножами.

Осмолиз происходит при внесении биологического материала в гипотонический раствор (вода или буферный раствор), который проникает в цитозоль, вызывая набухание и разрушение клеток. Затем ненужные органеллы клеток из обработанного таким способом биоматериала можно удалить. Для разделения мембранных белков требуется детергент, т.е. ПАВ с моющим действием (например, *TritonX-100*), который разрушит липидный биослой и высвободит интегральные мембранные белки. Методы, используемые для выделения и очистки белков, основаны на различиях в их растворимости, молекулярной массе, изоэлектрической точке и/или аффинности (сродстве) протеинспецифического связывания.

Экстракция белков

Нативные белки скелетной мышцы по их растворимости в водных растворителях можно разделить на три основные группы:

– саркоплазматические белки, растворимые в слабых растворах хлорида натрия (ионная сила 0,1); это глобулин X, альбумины, миоглобин и так называемая миогеновая фракция, которая включает большинство гликолитических ферментов. Чаще всего их экстрагируют с использованием фосфорного буфера с ионной силой 0,05 (15,5 мМ Na_2HPO_4 , 13,38 мМ KH_2PO_4 , рН 7,3). Эти белки называют также водорастворимыми белками;

– миофибриллярные белки, растворимые в нейтральных солевых растворах с ионной силой 0,5 (на практике – между 0,7 и 1,5). Их называют солерастворимыми. Обычно для их выделения используют 5 %-ный раствор NaCl с добавкой 0,02-0,003 М NaHCO_3 , имеющий рН 7,0-7,5. Для моделирования условий экстракции миофибриллярных белков при выполнении технологических операций (например, измельчение в процессе приготовления фаршевой эмульсии для колбасных изделий) рекомендуются более низкие концентрации NaCl (2,5-3,0 %). Актомиозин можно выделить из экстракта миофибриллярных белков, растворяя его в дистиллированной воде (объемное отношение 1:10-1:12) в условиях охлаждения. Осажденный актомиозин можно отделить центрифугированием, при этом надосадочная жидкость будет содержать саркоплазматические белки и небелковые азотные соединения;

– белки соединительной ткани (белки стромы), состоящие в основном из коллагена и эластина. Эти белки не растворяются в нейтральных солевых растворах с ионной силой 0,5 и в 0,05 М растворах NaOH и HCl .

Миофибриллярные белки, утратившие способность растворяться в нейтральном солевом растворе с ионной силой от 0,05 до 1,5 по причине денатурационных изменений (например, при хранении мышечной ткани в замороженном состоянии), образуют группу, различающуюся по своим связанным с растворимостью свойствам. Их обычно называют нерастворимыми белками. Тем не менее, эти белки хорошо растворяются в 0,05 М NaOH или

0,05 М НСl. Так, если осадок, полученный из экстракта солерастворимых белков, дополнительно экстрагировать, используя 0,05 М NaOH или 0,05 М НСl, то белки стромы останутся в виде осадка, а в надосадочной жидкости будут содержаться так называемые нерастворимые белки (то есть белки, не растворимые в солевых растворах).

Зависимость экстрагируемости растительных α -глобулинов и миофибриллярных белков мышечной ткани от концентрации хлорида натрия одинакова. Диапазон рН максимальной экстрактивности увеличивается с повышением концентрации NaCl. Соли двухвалентных катионов (например, $MgCl_2$ и $(NH_4)_2SO_4$) обычно более эффективны для экстрактируемости глобулярных белков, чем соли моновалентных (например, NaCl, NH_4Cl , KCl). В стандартизированных процедурах солубилизации растительных белков, т.е. коллоидного процесса самопроизвольного и обратимого проникновения солубилизата внутрь мицелл солубилизатора, используют NaCl при рН 9,0 (для получения фракции глобулинов), воду (для альбуминов), 70 %-ный этанол (для проламинов) и 0,05 М CH_3COOH (для глютелинов).

При экстракции водорастворимых молочных белков перед отделением эмульгированного жира и выделением белка из жидкой фазы молоко упаривают. В этих же целях используют различные физические (ультрацентрифугирование, мембранная микрофильтрация и электродиализ) и химические (осаждение в изоэлектрической точке и добавление ферментативных коагулянтов) методы.

Содержание белка (азота) в белковом экстракте чаще всего определяют биуретовым методом или методом Кьельдаля.

Депротенинизация

Депротенинизация – один из основных методов в анализе пищевых продуктов. Для депротенинизации и отделения «непротеиновой» фракции от «белковой» обычно используют один из пяти методов: химическое осаждение, осаждение термообработкой, ультрафильтрацию, диализ или очистку на хроматографической колонке.

Химическое осаждение

Химическое осаждение наиболее широко используется при анализе пищевых продуктов, поскольку выбор осадителя и выполнение самой процедуры не представляет особых затруднений.

Органические растворители (этанол, ацетон и ацетонитрил) воздействуют на пространственную структуру белковой молекулы, ослабляя гидрофобные взаимодействия и вступая в химическую реакцию с заряженными группами на ее поверхности. Это приводит к разрушению гидратной оболочки белковой молекулы и к денатурации белка. Полная денатурация белка достигается только в случае высокой концентрации осадителя (65-80%), при повышенной температуре (20-30 °С) и достаточно длительном времени осаждения (24 ч). Осаждение

этанолом (концентрация 80 %) рекомендуется для анализа свободных аминокислот, так как образец можно легко концентрировать промывкой спиртовых экстрактов хлороформом. Рекомендуется осаждение белкового остатка в этаноловом экстракте и добавление в экстракт насыщенного спиртового раствора хлорида цинка (объемное соотношение 500:0,5). Полную депротеинизацию в течение 15-30 мин вызывает ацетон с добавкой 1%-ного раствора HCl. Осаждение чистым ацетоном требует более длительного времени, обычно от 3 до 12 ч. Ацетонитрил, используемый в качестве депротеинизирующего вещества для мышечной ткани свежей свинины и ветчины сухого посола, в концентрации 66,6 % извлекал более чем 97 % свободных аминокислот.

Осаждение кислотами наиболее эффективно, если используется применительно к непереваренному (негидролизованному) белку. В случае переваренного белка может происходить неполное осаждение, при этом слишком высокая концентрация кислоты может вызвать частичный гидролиз белка. С учетом этого для разных материалов обычно требуются различные концентрации реагента.

Известно, что сульфосалициловая кислота (SSA) плохо извлекает аспарагиновую и глутаминовую кислоты, гистидин, аргинин, валин, изолейцин, леицин и лизин. Следует отметить, что SSA является одним из самых распространенных осадителей, используемых для анализа биологических материалов и сыра.

При осаждении вольфрамовой кислотой происходят потери аргинина, гистидина и лизина, которые образуют вольфрамат-белковые комплексы. Также отмечается, что фосфорновольфрамовая кислота очень плохо извлекает аргинин, орнитин и лизин, а также аспарагиновую и глутаминовую кислоты, аспаргин, глутамин и триптофан.

Депротеинизация 1 %-ным раствором пикриновой кислоты обеспечивает довольно хорошее отделение α -аминокислот, за исключением *Trp*, который при этом распадается, но вся процедура довольно сложна. С другой стороны, преимуществом отделения пикриновой кислотой является ее лучшая (относительно ТХК) способность осаждать полипептиды. Некоторые потери *Trp* наблюдаются при осаждении хлорной кислотой. Тем не менее, преимущество последней состоит в том, что ее избыток можно удалить из экстракта осаждением ионами калия.

ТХК – депротеинизирующее вещество, чаще всего используемое при анализе пищевых продуктов. Оно действует относительно быстро, а образующийся фильтрат легко отделяется от осадка. Кроме того, ТХК дешевле других осадителей. Доказана практически полная депротеинизация гомогенатов мяса рыбы в растворах ТХК концентрацией около 3 %. Тем не менее, безопаснее использовать более высокие концентрации ТХК (5 %), однако в растворах ТХК

концентрацией выше 12 % наблюдается частичный гидролиз белка. Неионный детергент *TritonX-100* рекомендуется в качестве соосаждающего носителя для осаждения белка в образцах, богатых липидами. ТХК практически не осаждает аминокислоты, пептиды, полипептиды и мукопротеины. Для анализа пептидов в депротеинизированных экстрактах мяса рыбы предложено применять двухступенчатое осаждение с использованием ТХК (сначала в 1 %-ных растворах, а затем в растворах концентрацией 5 %), что предотвращает соосаждение пептидов.

Осаждение термообработкой

Термоденатурированный белок не растворим в изоэлектрической точке. Подкисление воды, используемой в качестве теплоносителя, до изоэлектрической точки присутствующего в образце белка значительно облегчает и ускоряет депротеинизацию. Для этого чаще всего используют уксусную кислоту в концентрации 0,12 %.

Белки различаются по температуре их термической денатурации. Процесс денатурации белка может начинаться в диапазоне температур 80-100 °С и заканчиваться после 3-5 мин нагревания. Выдержать кратковременное нагревание при таких температурах могут лишь некоторые белки, например, желатин и рибонуклеаза. Кроме того, терморезистентны некоторые протеазы и пептидазы, которые выдерживают нагревание в течение некоторого времени и могут гидролизовать белки в условиях оптимальных температур, что искажает фактические соотношения белковой и небелковой фракций. С учетом этого рекомендуется осуществлять термическую депротеинизацию путем гомогенизации образца очень горячей водой (95-100 °С), при этом результирующая температура должна быть не ниже 80 °С и поддерживаться на этом уровне в течение 5 мин.

Фильтрация

Фильтровальная бумага годится только для фильтрования гомогенатов, полученных при значительном превышении объемов кислых осаждающих растворов (например, 5 %-ного раствора ТХК) по сравнению с массой (объемом) образца (при соотношении 10:1 и более). Фильтровальная бумага средней плотности гарантирует достаточно высокую скорость выполнения операции и не нуждается во всасывающем давлении. С другой стороны, гравитационная фильтрация белков экстрактов через фильтровальную бумагу очень трудоемка. Как правило, фильтрация осуществляется слишком долго, и размер пор постепенно уменьшается из-за засорения, которое может повлиять на состав фильтрата. Фильтрация через пластмассовые (поливинилхлоридные, полиамидные) фильтры с более однородными и стабильными порами, которые лучше работают в сочетании с воронками Бюхнера-Хартли, также непрактична при выполнении производственных анализов и потому часто заменяется

центрифугированием.

Вакуум-фильтрование гидролизатов белка, содержащих высокие концентрации кислот или щелочей, более эффективно при использовании фильтров из пористого стекла, чаще всего *G-3* и *G-4* (размеры пор 15-40 мкм и 5-15 мкм, соответственно). Необходимое давление всасывания составляет порядка 2,7-8,0 гПа (20-60 мм рт. ст.) и создается водоструйным насосом или ротационным вакуум-насосом с пароотделителем. Фильтры *G-0* и *G-1* (размеры пор 150-200 мкм и 90-150 мкм, соответственно) используются для вакуум-фильтрации гомогенатов тканей, полученных при большом соотношении образца к осадителю (более чем 1:1) и при высокой концентрации экстракта исследуемого вещества. Поскольку поры таких фильтров относительно большие и легко закупориваются при фильтрации, рекомендуется помещать сверху круг влажной фильтровальной бумаги. Фильтры *G-5* (размер пор 1-2 мкм) настолько мелкие, что могут использоваться для отфильтровывания бактерий.

Ультрафильтрация

Ультрафильтрация через полисульфоновые или полиамидные мембраны чаще всего используется для экстракции, депротеинизации, разделения, очистки и концентрирования. Используемые для ультрафильтрации мембраны характеризуются границей отсечки по молекулярной массе (*molecular weight cut off – MWCO*). Это неточная характеристика мембраны, поскольку она зависит от времени удерживания растворенного вещества, которое зависит от размера частиц и природы растворенного вещества, а также от характера взаимодействий мембрана/растворенное вещество, рабочих условий и состояния используемой аппаратуры. Для депротеинизации чаще всего используют мембраны с границей отсечки 10000. Величины молекулярных масс веществ, разделяемых ультрафильтрацией, должны отличаться не менее чем на порядок. Фильтры для удаления загрязнителей предварительно промывают, обрабатывая ультразвуком в дистиллированной воде. Фильтрация чаще всего осуществляется центрифугированием или под давлением. Этот метод считается одним из лучших, поскольку он быстрый и не вызывает потерь аминокислот и денатурации белков.

Центрифугирование

Центрифугирование широко используется для разделения гомогенатов тканей на супернатант (жидкая фаза, остающаяся после того, как нерастворимые вещества осаждаются в процессе центрифугирования или осаждения) и полутвердый осадок. Эффективность центрифугирования при удалении диспергированных частиц и суспензий из белковых экстрактов тканей зависит в основном от *g*-значения (ускорения), времени центрифугирования и плотности частиц. Ядра, неповрежденные клетки, соединительная ткань, сарколемные оболочки и миофибриллы седиментируются при 200*g* 10-15 мин

центрифугирования, саркосомы – после центрифугирования в течение 10-20 мин при 2000-10 000 g. Лизосомы и «тяжелые» микросомы центрифугируют 20-30 мин при 10000-25000g; микросомы, полисомы, рибосомы и фрагменты сарколеммы седиментируются после 120-180 мин центрифугирования при 25000-100000 g.

Высаливание

Для осаждения белков из растворов обычно используют соли, содержащие поливалентные анионы (сульфаты аммония, натрия и магния, цитрат натрия, фосфат аммония), так как эти соли более эффективны, чем одновалентные. Чаще всего используют сульфат аммония – он очень хорошо растворяется в воде, что позволяет получать высокие концентрации (насыщенные растворы – это растворы 3,9 М при 0 °С и 4,1 М при 25°С). Кислотность концентрированных растворов сульфата аммония (рН около 5,5) обусловлена его гидролизом. Перед использованием растворов их рН должен быть доведен до нужного значения путем внесения NH_4OH или H_2SO_4 . Широко используемый метод высаливания белков сульфатом аммония предполагает добавление соли в виде сухого вещества или в составе насыщенного раствора. Смешивание раствора белков и насыщенного раствора сульфата аммония в равных количествах (50 %-ное насыщение) обычно является достаточным для высаливания большинства глобулярных белков. Для альбуминов, однако, требуется значительно более высокое (более 80 %) насыщение. Следует иметь в виду, что отдельные белки, в зависимости от их структуры и свойств, требуют конкретных концентраций сульфата аммония, которые определяют экспериментально. Различия между белками дают возможность использовать «обратный» метод для фракционирования высоленных сульфатом аммония белков. Белок, осажденный при 80 %-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и помещенный в колонку (например, с *Sephadex G-200*), может быть фракционирован после элюирования с линейным градиентом $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ с 80 до 0 % или с 80 до 40% насыщения при рН 7.

Диализ и электродиализ

Диализ обычно используют для отделения макромолекул от ионов или концентрирования белковых дисперсий путем выпаривания воды в вакууме, а также для удаления низкомолекулярных соединений из белковых дисперсий. Химическое сродство свободных аминокислот и пептидов к нативным белкам довольно низкое, поэтому для разделения подобных смесей можно использовать метод мембранно-молекулярного просеивания (гель-фильтрация), основанный на разнице размеров частиц. Для этого необходимо выбрать мембрану с подходящим размером пор. Например, в *Bio-Fiber 20* (ацетилцеллюлоза), *Bio-Fiber50* (целлюлоза) и *Bio-Fiber80* (ацетилцеллюлоза) номинал *MWCO* (*Molecular Weight Cut Off* – показатель пористости ультрамембран) равен 200, 5000 и 30000

соответственно. Для концентрирования белковых дисперсий предложен простой метод диализа с использованием полиэтиленгликоля.

Электродиализ существенно сокращает время операции. Проблемы, связанные с избыточным отрицательным зарядом синтетических мембран, могут быть преодолены путем периодического изменения направления диализа.

Потери анализа (особенно низкомолекулярных соединений) характерны для всех методов диализа. Поэтому наилучшие результаты достигаются при использовании диализа для обессоливания и разделения высокомолекулярных белков.

Групповая очистка и фракционирование белков с использованием улавливающих хроматографических колонок

В настоящее время имеется широкий ассортимент коротких колонок для очистки, предварительного концентрирования, обессоливания и замены буфера, а также группового разделения белков.

Твердофазная экстракция (ТФЭ, *SPE*) – более эффективный метод подготовки образца, чем традиционная жидкостная экстракция (ЖЖЭ, *LLE*). Этот метод применяют в следующих целях:

- очистка образца (удаление примесей или выделение анализа из матрикса);
- концентрирование образца (селективное концентрирование анализа перед его определением).

Серийно выпускаемые колоночные процессоры (*Bakerbond Spe*, *Speediski* другие) состоят из нескольких небольших колонок (чаще всего объемом от 1 до 6 см³), заполненных различными фазами (адсорбционной или обращенной фазой, катион- или анионообменной, гидрофильной или гидрофобной, молекулярным ситом), содержащих крупнопористые сорбенты (10-50 мкм) с большой площадью поверхности частиц и поглотительной способностью, которые позволяют охарактеризовать белок посредством приблизительной оценки его изоэлектрической точки (*pI*), гидрофобности и молекулярной массы. После каждого этапа анализа одновременно достигаются очистка/обессоливание и концентрирование образца. Процессор положительного давления гарантирует одинаковую скорость потока во всех колонках и воспроизводимую экстракцию белковых веществ в мелкомасштабном режиме.

Быстрое обессоливание колонки может использоваться в различных целях, включая обессоливание экстракта, которое требует группового разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ. Наиболее удобны быстрые обессоливающие колонки, заполненные *Sephadex G-25 Superfine*, которые позволяют отделить высокомолекулярные белки или полипептиды от остальных молекул, имеющих молекулярную массу ниже предела отсечки (5000). Метод относительно быстрый – каждый прогон занимает от 1 до 4 мин в зависимости от объема пробы и скорости потока.

5.2.2 Аналитические методы определения содержания белков, пептидов и аминокислот

Поиски «идеального» метода, позволяющего определить концентрацию белка, насчитывает более 70 лет. Однако эта проблема до сих пор не решена окончательно из-за сложности и уникальности структуры различных молекул белка.

На сегодняшний день существует множество методов количественного определения белков. Наиболее простым среди физических методов является взвешивание чистого белка, что бывает затруднено из-за его высокой гигроскопичности. Воду проблематично полностью удалить из состава белка, и этот метод количественного определения используется редко. Кроме того, белок в пищевых продуктах находится в связанном состоянии, поэтому весь его выделить из исследуемого объекта известными способами практически невозможно.

На практике чаще всего используют химические методы, которые основываются на количественном определении общего, или белкового, азота. Это становится возможным из-за того, что его содержание в различных белках варьируется в ограниченных пределах, позволяя определять количество белка в биологическом объекте по количеству азота.

Методы Кьельдаля

Методы Кьельдаля – основной метод анализа пищевого белка, используемый в качестве стандартного арбитражного метода. При правильном выполнении метод Кьельдаля гарантирует высокую прецизионность и хорошую воспроизводимость результатов. Средняя ошибка метода не превышает 1 %. Метод Кьельдаля основан на минерализации белоксодержащей пробы серной кислотой в присутствии катализатора.

Основные различия в многочисленных вариантах метода Кьельдаля заключаются в выборе катализатора, используемого для минерализации, и в способе дистилляции и титрования аммиака. Для всех имеющихся вариантов процедура метода Кьельдаля состоит из пяти стадий:

- 1) подготовка и взвешивание образца;
- 2) добавление реагентов;
- 3) минерализация;
- 4) паровая дистилляция (отгонка с паром) аммиака;
- 5) титрование.

Образец должен быть гомогенным, насколько это возможно, и иметь массу от 0,2 до 2,0 г в зависимости от содержания белка в анализируемом продукте. При содержании белка от 5 до 25% оптимальная масса образца составляет 0,5-1,0 г.

Метод Кьельдаля предусматривает добавление к образцу реагентов трех

типов, каждый из которых выполняет определенную функцию в процессе минерализации:

1) серная кислота окисляет органические соединения с образованием диоксида углерода и воды и индуцирует распад и трансформацию азотистых соединений в свободный аммиак, который впоследствии связывается сульфатом аммония;

2) соли (K_2SO_4 , Na_2SO_4) необходимы для повышения температуры минерализации;

3) катализаторы используются для ускорения процесса окисления. Применяемые катализаторы: металлы – Hg, Cu, Se; оксиды – CuO, HgO, P_2O_5 , TiO_2 ; пероксиды – H_2O_2 ; соли – $CuSO_4$, Hg_2SO_4 .

Наиболее эффективные и доступные катализаторы – ртуть и оксид ртути. Их применение, тем не менее, радикально сократилось из-за вредного воздействия на окружающую среду. Кроме того, эти катализаторы имеют общий недостаток, заключающийся в образовании комплексов с аммиаком, что затрудняет дистилляцию последнего. Для разложения ртутно-аммиачного комплекса в образец добавляют тиосульфат натрия или салициловую кислоту.

При использовании меди в качестве катализатора минерализация занимает больше времени, чем при использовании ртути. Тем не менее, соединения меди менее вредны и потому используются чаще, чем ртутные катализаторы. В официальных прописях метода Кьельдаля, одобренных *ISO* и Ассоциацией официальных химиков-аналитиков (*AOAC*), $CuSO_4$ рекомендован как наиболее эффективный и экологически нейтральный медьсодержащий катализатор.

Селен используется в качестве катализатора в небольших количествах. При использовании больших количеств селена в условиях длительной минерализации он может вызвать потерю азота и его неполное восстановление.

Реагенты, относящиеся к группе 2 и 3, изготавливают в виде специальных таблеток или смесей, содержащих K_2SO_4 или Na_2SO_4 и различные катализаторы. Например, таблетки фирмы *Tecator* содержат K_2SO_4 один из пяти различных катализаторов; широко известна семеновая смесь содержит Na_2SO_4 (90 %), Hg_2SO_4 (7 %), $CuSO_4$ (1,5 %) и селен (1,5 %).

Минерализация используется для преобразования всего содержащегося в образце азота в неорганический трехвалентный азот. Присутствие серной кислоты ограничивает температуру минерализации точкой кипения серной кислоты (338 °C). Добавки солей (K_2SO_4 или Na_2SO_4) повышает температуру кипения минерализата, сокращает время разложения органических соединений и облегчает разложение трудно минерализуемых веществ. Точка кипения серной кислоты возрастает линейно к соотношению K_2SO_4/H_2SO_4 (г/мл) и достигает 383 °C при соотношении K_2SO_4/H_2SO_4 1:1, при соотношении K_2SO_4/H_2SO_4 2:1 температура кипения повышается до 450 °C. Внесение K_2SO_4 в минерализат приводит не только к повышению точки кипения, но и к дополнительному

расходу серной кислоты по причине образования бисульфата калия.

Некоторые пищевые продукты содержат устойчивые к минерализации азотсодержащие соединения. К таким соединениям относятся нитраты, нитриты, алкалоиды, пиридин, производные хинолина, триазолы, пиразолоны, аминопирин и антипирин. Чтобы определить азот в таких соединениях методом Кьельдаля, пробы необходимо дополнительно обрабатывать подходящими восстановителями, такими как хром, цинк, сульфат железа (VI), салициловая кислота и сахароза. Восстановление может выполняться перед минерализацией или непосредственно в процессе минерализации.

Образцы пищевых продуктов, которые, помимо белков, содержат липиды, минерализуются особенно тяжело и больше предрасположены к вспениванию, чем образцы с высоким содержанием белков или углеводов. Для предотвращения вспенивания можно использовать кипяtilьные гранулы (стеклянные трубочки, обычно 6 мм в диаметре), либо добавить несколько капель пероксида водорода или октанола, либо использовать специальную антивспенивающую эмульсию. Использование двухстадийного нагревания позволяет пренебречь антивспенивающими веществами. На начальной стадии процесса минерализации, пока образец еще не карбонизирован, нагревание пробы производится постепенно примерно до 200 °С. Вторая стадия процесса (собственно минерализация) начинается при достижении температуры 420 °С и продолжается, пока минерализат не станет полностью прозрачным. Как только минерализация закончится, колбы с минерализатом охлаждают до комнатной температуры.

Отогнанный аммиак титруют соляной кислотой (если используется борная кислота), либо гидроксидом натрия (если используется соляная кислота). При титровании удобно использовать индикатор *Tashiro* (0,2 г метилового красного и 0,19 г метиленового голубого, растворенного в 100 мл этанола) или кондуктометр.

На основании титрования определяют массовую долю азота в анализируемой пробе. Количество белкового азота позволяет рассчитать содержание белка. Для этого используют коэффициент пересчета, при этом универсальный белковый коэффициент равен 6,25, что рассчитано на основании среднего содержания азота в большинстве белков составляет 16 %. Для более точных значений используют коэффициенты пересчета с учетом фактического содержания белка в тех или иных продуктах.

Абсорбционная УФ-спектрофотометрия. Метод Вартбурга и Христиане

Белки и пептиды, содержащие ароматические аминокислоты, особенно тирозин и триптофан, можно определить методом УФ-спектрофотометрии, также известным как *метод Вартбурга и Христиане*. Нуклеиновые кислоты имеют интенсивную полосу поглощения ультрафиолетовой области в том же диапазоне волн, что и белки, однако их полоса поглощения в области 260 нм более

интенсивна, чем в области 280 нм, тогда как спектр поглощения белков имеет противоположный профиль. Поэтому, определяя оптическую плотность разбавленного белкового раствора при 280 и 260 нм, можно до некоторой степени устранить мешающее влияние нуклеиновых кислот. Этот метод имеет ограничение по определению белка в объектах, в которых содержание нуклеиновых кислот превышает 20 %, что приводит к искажению получаемых результатов.

Предложена упрощенная формула 5.7 для вычисления концентрации белка (мг/мл) по результатам спектрофотометрического анализа:

$$P_c = 1,45D_{280} - 0,74D_{260} \quad (5.7)$$

Разработан также прямой спектрофотометрический метод определения белков, основанный на разнице оптических плотностей при 235 и 280 нм. Основное его достоинство – устранение интерференции нуклеиновых кислот, имеющих полосы поглощения в области 280 и 235 нм.

Определение белков методом УФ-спектрофотометрии выполняется очень быстро, однако дает значительную ошибку при анализе смесей, содержащих более 20 % нуклеиновых кислот, или в случае мутных растворов. Этот метод рекомендуется для сравнительных анализов большой серии образцов с относительно низкими концентрациями белка или в тех случаях, когда высокие содержания солей аммония исключают использование других аналитических методов. Метод чаще всего используется для анализа скорости протеолиза или определения содержания пептидов и белков в хроматографических элюентах.

Биуретовый метод и его модификации

Классический биуретовый метод

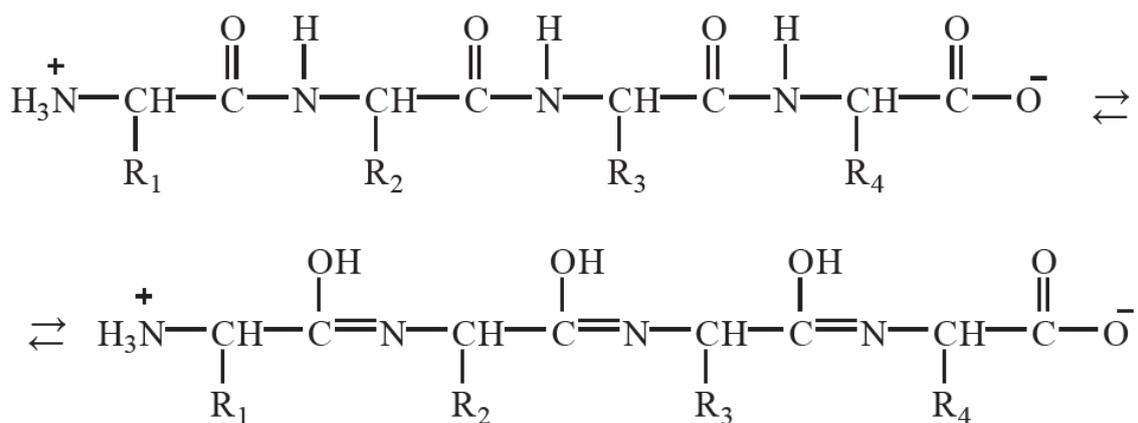
Биуретовая реакция основана на образовании пурпурного комплекса между ионами меди и амидными или пептидными связями белка в сильнощелочных средах. Каждый ион меди в зависимости от разновидности белка образует хилатный комплекс с 4-6 атомами азота пептидов. Эта реакция характерна для всех соединений, молекулы которых содержат две группы – CO-NH-, связанные одним из следующих способов:

– непосредственно (например, в диамиде щавелевой кислоты, H₂N-CO-CO-NH₂);

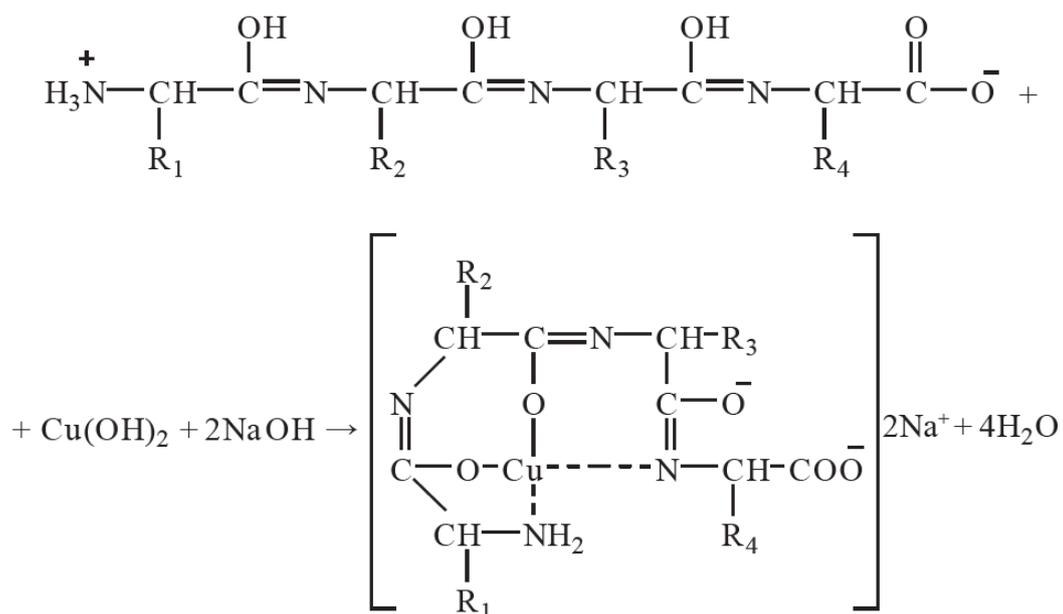
– через азот (в биурете);

– через атом углерода (например, в диамиломалоновой или янтарной кислоты и в белковых гидролизатах).

Равновесие кето- и енольной формы белка можно представить в следующем виде:



Енольная форма белка способна реагировать с ионами меди (II), который замещает водород оксигруппы с образованием связи с азотом, координируемой в пространстве:



При этом биуретовый комплекс будет иметь окраску, интенсивность которой будет зависеть от длины цепи пептида и изменяться от сине-фиолетовой до красно-фиолетовой и красной. Интервал длин волн 540-640 нм будет обладать максимальной чувствительности определения. Свободные аминокислоты и дипептиды не вступают в биуретовую реакцию, в отличие от трипептидов, олигопептидов и белков. Пролиновые пептиды не образуют комплексов с медью, поглощающих ультрафиолет, тогда как пролиловые пептиды образуют подобные комплексы. Это объясняет тот факт, что желатин, содержащий пропорции пролина и остатков *НОР*, менее реакционноспособен по отношению к ионам меди, чем другие белки. Казеин и миофибриллярные белки также образуют цветные биуретовые комплексы, менее интенсивно окрашенные по сравнению с медьсодержащими комплексами альбумина и саркоплазматических белков.

Для повышения стабильности биуретовых комплексов предлагается использовать гликоль, тартрат и цитрат. Был оптимизирован состав стабилизированного тартратом биурета и предложили простую процедуру для определения общего содержания белка, альбумина и глобулина в сыворотке крови.

Биуретовая реакция считается довольно простой и быстрой. Основной недостаток этого метода – относительно низкая чувствительность и влияние помех при наличии «посторонних» участников реакции, например, если исследуемый образец белка содержит различные тиолы, сахара, липиды, дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) в высоких концентрациях. Поэтому биуретовый метод подвергался ряду модификаций, которые рассмотрены ниже.

Колориметрическое определение белка в присутствии тиолов

Мешающее влияние тиолов (*P*-меркаптоэтанола, *P*-меркаптоэтиламина, глутатиона) в большинстве случаев может быть предотвращено использованием биуретового реагента, который образует комплексы с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА, *EDTA*), однако в образцы, содержащие дитиотреитол (ДТТ, *DTT*), перед внесением биуретового реактива необходимо добавлять йодацетамид.

Колориметрическое определение белка в присутствии мешающих веществ, растворимых в ТХК

Метод включает осаждение белка, отделение осадка от фильтрата, растворение осадка в растворе гидроксида натрия или калия и последующее определение белка с биуретовым реактивом. Белки полностью осаждаются в растворах ТХК с концентрацией от 5 до 25 % в зависимости от состава и свойств белка.

Колориметрическое определение белка в образцах продуктов с высоким содержанием липидов

Колориметрический анализ белка в образцах продуктов с высоким содержанием липидов (или фосфолипидов) затруднен в связи с образованием мутных экстрактов. Поэтому перед проведением биуретовой реакции необходимо удалить липиды из образцов, например, посредством экстракции смесью ацетон/петролейный эфир (1:1). После удаления липидов образцы растворяют в 10 %-ном растворе дезоксихолата натрия или гидроксида натрия и обрабатывают биуретовым реактивом.

Колориметрическое определение белка в присутствии редуцирующих сахаридов

Редуцирующие сахара также препятствуют определению белка с биуретовым реактивом. Поэтому для окисления сахаров к экстракту, обработанному ТСА, добавляют пероксид водорода. Кроме того, 10-кратное увеличение концентрации биуретового реактива (15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 60 г $\text{K,Na-тартрата} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в 1 л 7,5 М NaOH) улучшает чувствительность метода и

позволяет его применять для определения пептидов в пищевых суспензиях.

Спектрофотометрическое определение белка в присутствии ДНК

Спектрофотометрический метод определения светопоглощения в УФ-области спектра комплекса, образованного белком и ионами меди в сильнощелочных растворах сульфата меди (II), в 10-15 раз чувствительнее, чем стандартный биуретовый метод, и позволяет определить белок даже в очень разбавленных растворах, содержащих от 0,01 до 0,1 мг/мл белковых веществ.

Предложено измерять светопоглощение медно-белковых комплексов при 263 нм, используя 0,04%-ный раствор сульфата меди в 2 М гидроксиде натрия. Выбор длины волны для белковых дисперсий, содержащих ДНК, ограничен очень высоким светопоглощением ДНК. Поэтому была разработана методика, основанная на измерении оптической плотности растворов при 310 нм, которую можно успешно использовать для белковых дисперсий, содержащих ДНК в количествах до 0,7 мг/мл.

Метод Лоури

Колориметрический метод, разработанный Лоури, основан на реакции реагента Фолина-Чокалтеу с пептидными группами белков и пептидов ароматических аминокислот в щелочных средах.

Реакция протекает в две стадии:

- 1) протекание биуретовой реакции, при которой ион меди (Cu^{2+}) образует комплекс с белком и пептидами, содержащими, по меньшей мере, две пептидные связи;
- 2) восстановление фосфорномолибденовой кислоты (реактив Фолина) комплексом Cu^{2+} -белок до молибденовой сини.

Реактив Фолина-Чокальтеу взаимодействует с рядом других соединений, включая некоторые свободные аминокислоты, тиоловые соединения, сахарозу и другие сахараиды, липиды и жирные кислоты, амины, триметиламиноксид, комплексообразователи, например, *EDTA*, некоторые буферные растворы и реагенты.

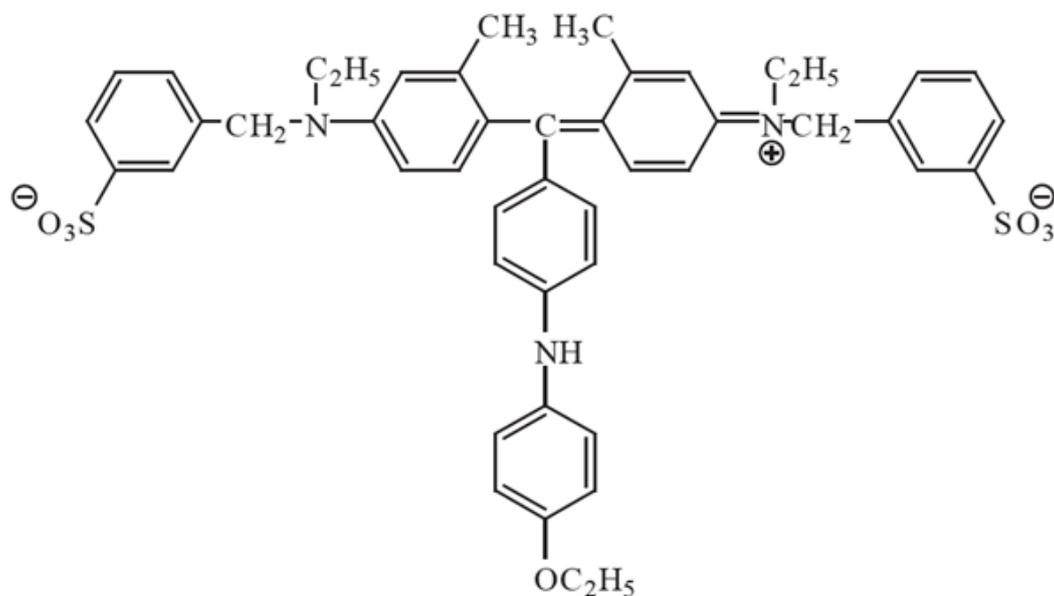
Чтобы исключить или ограничить мешающее влияние сопутствующих соединений при анализе белка, метод Лоури подвергался ряду модификаций, включая нагревание образца перед его обработкой реактивом Фолина-Чокальтеу и после нее, добавление пергидрата, хлорамина-Т, *SDS*, экстракцию органическими растворителями для удаления липидов и т. д. Тем не менее, наиболее полезными представляются модификации этого метода, включающие параллельное измерение оптической плотности образцов в отсутствии (образец A_1) и в присутствии (образец A_2) иона меди и определение «белка» по разнице $A_2 - A_1$, первоначальное осаждение белка с помощью ТХК или смесью дезоксихолат-ТХК и анализ его после солубилизации в выщелачивающем растворе. Для анализа пептидов, растворимых в ТХК-экстрактах мышечных

тканей, использовали методику, сходную с вышеупомянутой, полагая, что $A_2 - A_1 = A_{PEP}$ соответствует «пептидам», а A_1 – «тироzinу», хотя триптофан, обработанный реактивом Фолина-Чокальтеу, также дает отчетливую окраску растворов. При этом в случае фенилаланина, гистидина, лизина, таурина и других растворимых в ТХК веществ наблюдается слабая окраска растворов. Из 57 исследованных мешающих соединений только восстановленный глутатион снижал A_{PEP} тогда как A_1 включает также содержащие триптофан олигопептиды.

На практике, однако, чаще всего используется оригинальный метод Лоури. Его популярность связана в основном с высокой чувствительностью, которая в 100 раз превышает чувствительность биуретового метода и в 10 раз – спектрофотометрического.

Метод Бредфорда

Данный метод основан на взаимодействии белков с кислотным красителем кумасси синего (*Coomassie Brilliant Blue G-250*), происходящего под действием электростатического связывания сульфонильных групп красителя с аминокислотными остатками. Наиболее чувствительным к красителю является аргинин, менее интенсивно – остатки гистидина, тирозина, триптофана и фенилаланина [14].



Краситель Coomassie Brilliant Blue G-250

При взаимодействии образуется комплекс с голубого цвета с максимумом поглощения при 595 нм, при этом максимум поглощения исходного реагента составляет 465 нм.

Данный метод очень чувствителен и надежно определяет белок в диапазоне от 10 до 100 мкг/см³. При этом увеличение концентрации красителя позволяет

повышать его чувствительность. При использовании данного метода важно строить градуировочные графики с использованием в качестве стандарта белок, который предполагается определять в анализируемом объекте.

Реагенты, используемые в методе Бредфорда, обладают большим сродством к альбуминам, в методе Лоури – к глобулинам. Биуретовый метод одинаково выявляет белки различной структуры, но обладает недостаточной аналитической чувствительностью [14].

Спектрофотометрический метод с применением 2,4,6-тринитробензол-1 - сульфоновой кислоты.

2,4,6-Тринитробензол-1-сульфо кислота (*TNBS*) вступает в реакцию только с основными аминогруппами аминокислот, пептидов и белков в слабоосновной среде (рН 8-9). В условиях низких значений рН реакция не протекает.

Эти недостатки метода способствовали разработке модифицированного *TNBS*-спектрофотометрического метода. Использована следующая последовательность аналитических операций: смешивали 1,0 мл анализируемого раствора (с концентрацией образца 0,01-0,87 мкмоль/мл), 1,0 мл 4%-ного бикарбоната натрия и 1,0 мл 0,1%-ной *TNBS*. Полученную смесь выдерживали в темноте при 40 °С в течение 2 ч, затем после подкисления полученного раствора 1 М HCl измеряли его оптическую плотность при 340 нм. В таких условиях кинетика формирования цвета для различных аминов, аминокислот, пептидов и белков практически идентична, за исключением двух пептидов (карнозина и глутатиона), значения оптической плотности которых примерно на 2,5 % выше относительно конечной концентрации N.

Выявлено, что α - и ϵ -аминогруппы в исследуемом образце вступают в реакции второго порядка с активной непротонированной аминогруппой. SH-группа цистеина реагирует с *TNBS*. Аммиак не образует комплекс с *TNBS*, а мочевины немного замедляет реакцию *TNBS* со свободными аминогруппами. С другой стороны, высокая (8 М) концентрация мочевины устраняет различия в скорости протекания реакций аминогрупп в составе различных белков. В процессе анализа важно поддерживать постоянную температуру, рН и время реакции.

Данный метод подвергался многочисленным модификациям и улучшениям в целях его адаптации для совместного определения аминов, аминокислот и белковых смесей, а также для определения доступного лизина в белках, определения не реагирующих с *TNBS* аминогрупп белка с использованием *SDS* и определения белка непосредственно в гидролизатах, полученных путем обработки 6 М HCl. Важные модификации этого метода предназначены для определения степени гидролиза пищевого белка в гидролизатах и анализа степени расщепления белков в мясе и сыре методом *TNBS*.

Многочисленные результаты, полученные при определении белка в

пищевых продуктах методом *TNBS*, дают хорошую корреляцию с результатами, полученными методом Кьельдаля в редакции *АОАС*. Чувствительность метода *TNBS* в несколько раз выше абсорбционной УФ-спектрофотометрии. Основное преимущество метода *TNBS* обусловлено его высокой специфичностью и низкой чувствительностью к мешающим веществам.

Метод Поупа и Стивенса

Классическая процедура Поупа и Стивенса

Свободные аминокислоты и пептиды образуют хорошо растворимые комплексы с фосфатом меди. После удаления избытка нерастворимого фосфата меди центрифугированием или фильтрацией комплекс меди с аминокислотами в фильтрате или супернатанте определяют йодометрическим методом. Такие комплексы имеют интенсивный голубой цвет, а максимум их оптической плотности наблюдается при 620 нм. Интенсивность цвета комплекса зависит от концентрации и типа аминокислоты. В большинстве случаев две молекулы аминокислоты стехиометрически реагируют с одним ионом меди, образуя соединение голубого цвета, однако гистидин образует соединение при соотношении ионов меди и молекул гистидина 2:3. Растворимость медного комплекса цистина значительно ниже, чем соединений, образованных другими аминокислотами. Не все аминокислоты образуют одинаково окрашенные соединения, хотя для большинства из них совпадение по цвету колеблется от 98 до 107 % от ожидаемых значений.

При использовании фосфата меди, отмытого от избытка фосфата и суспендированного в тетраборате натрия, были получены более удовлетворительные и воспроизводимые результаты. Для трех аминокислот (гидроксипролина, лейцина и треонина) получен более высокий результат (102%), тогда как результаты определения гистидина и цистина оказались неудовлетворительными.

Метод Поупа и Стивенса является довольно специфическим по отношению к свободным аминокислотам, однако реакция инициируется также пептидами и белками, присутствующими в экстрактах биологических материалов и в белковых гидролизатах. Аминокислоты в составе олигопептидов количественно определяют йодометрическим титрованием их медных комплексов, при этом вовлеченность в реакцию зависит как от молекулярной массы, так и от состава аминокислот. Результаты, полученные для дипептидов, содержащих *Trp* и *Tyr*, подобны результатам, полученным для свободных тирозина и триптофана. Трипептиды, не содержащие ароматических аминокислот (например, триглицин и α -аланилглицилглицин), показали результаты, близкие к результатам основной группы свободных аминокислот. Для глутатиона (редуцированного и окисленного) и тетрапептидов получены сходные результаты (около 30 % от результатов для *Glu*). Полипептиды (например, бацитрацин) вовлекаются в

реакцию очень слабо (около 15 % от результатов для *Glu*), а белки с молекулярной массой, превышающей 14 кДа, практически не влияют на результаты определения α -аминного азота.

Спектрофотометрическая модификация метода Поупа и Стивенса

Разработан простой и быстрый спектрофотометрический метод для определения аминокислот и пептидов, основанный на цветной реакции образования медного комплекса с аланином, которую использовали при изучении скорости гидролиза белка. Интенсивность поглощения окрашенных соединений, образуемых 16 видами аминокислот, изменялась от 79,8 (глицин) до 125,9 % (гидроксипролин). При спектрофотометрических определениях окрашенных соединений меди с аланином этот диапазон составил от 98,2 до 103,6 %, а отклонение результатов анализа от 100 % составило 11,2 %, что является удовлетворительным для большинства аналитических задач. Количество меди, связанной с гистидином и некоторыми другими аминокислотами, зависит от pH раствора. Поэтому необходим тщательный контроль pH растворов. На результаты анализа не влияет присутствие молочной кислоты, глюкозы, галактозы, сахарозы, инозитола, маннитола и хлорида аммония, которые не образуют окрашенных соединений с ионами меди.

Формольное титрование

Аминогруппа аминокислот образует с формальдегидом метиленовые производные и теряет положительный заряд, при этом карбоксильную группу метилен-аминокислот можно оттитровать растворами щелочей в присутствии индикатора фенолфталеина или тимолфталеина. Количество освобожденных карбоксильных групп эквивалентно количеству аминокислот в анализируемом растворе. Метод не специфичен, так как, кроме свободных аминокислот, в реакцию с нейтральным формальдегидом вступают также пептиды и белки. Кроме того, пролин образует с формальдегидом нестабильное соединение, что снижает эффективность титрования. И напротив, тирозин, содержащий фенольную группу, образует устойчивое метиленовое производное. Метод формольного титрования не может применяться в присутствии солей аммония, поскольку последние вступают в реакцию с формалином с образованием уротропина и выделением эквивалентного количества кислоты. В лабораторной практике этот быстрый метод зачастую играет вспомогательную роль при определении продуктов ферментативного гидролиза белков мяса, хотя некоторые авторы рекомендуют формольный метод для определения общего содержания белков в пищевых системах, особенно молочных и/или мясных белков.

Бицинхониновый метод

Бицинхониновая кислота (2,2'-дихинолил-4,4'-дикарбоновая кислота) – высокоспецифический хромогенный реагент для ионов Cu (I), который образует с

ними пурпурный комплекс с максимумом оптической плотности при 562 нм. Эта реакция используется для анализа белка, поскольку в ходе нее происходит восстановление Cu (II) до Cu (I) . При комнатной температуре цвет комплекса постепенно усиливается примерно в течение 21 часа, а инкубация смеси при 37 или 60 °C позволяет сократить время анализа до 30 мин или 10-15 мин соответственно. Оптическая плотность окрашенного продукта реакции прямо пропорциональна концентрации белка, хотя некоторые сопутствующие вещества (например, *DTT*, глицин и детергенты) в высокой концентрации способны искажать результаты анализа. Это метод довольно чувствителен и может использоваться для измерения очень разбавленных концентраций белка при малых объемах исследуемых образцов. В пробирочных анализах этот метод позволяет точно измерять концентрации белка порядка 10-30 мкг/мл, он может рассматриваться как альтернатива реактиву Фолина-Чокальтеу в методе Лоури. Изменения интенсивности окраски, отражающей содержание белка в образце, подчиняются той же зависимости, что и в методе Лоури. Интенсивность окраски белковых растворов возрастает в следующем порядке: желатин, авидин, бычий сывороточный альбумин, иммуноглобулин G, химотрипсин, инсулин и рибонуклеаза.

Нингидриновый метод

Окислительное дезаминирование аминокислот нингидрином в кислых средах приводит к образованию аммиака и восстановлению нингидрина до гидриндантина. При последующем конденсировании аммиака гидриндантином образуется дикетогидриндилиден-дикетогидриндамин (*DYDA*) – вещество характерного пурпурного цвета, но его образование возможно только в присутствии восстановителя, способного продуцировать гидриндантин. В методе, разработанном Муром и Стейном, восстановителем служит дихлорид олова. Более стабильный по сравнению с дихлоридом олова цианистый калий использовался в методе Йемм-Коккинга. В работе предложено восстанавливать нингидрин борогидридом натрия, который имеет ряд преимуществ по сравнению с классическими восстановителями. Показано, что органические растворители (этанол, диоксан, метоксиэтанол, пиридин и фенол) ускоряют формирование окраски в зависимости от концентрации растворителя. Учитывая это, процедура Йемм-Коккинга была упрощена путем исключения восстановителя и использования в качестве органического растворителя глицерина (60%-ного).

Несмотря на быстроту и чувствительность, нингидриновый метод имеет свои недостатки, которые следует учитывать при использовании этого метода. В стехиометрической реакции участвуют большинство аминокислот, давая количественный выход *DYDA*, однако реакция с цистином свидетельствует, что только половина аминокислот участвует в реакции, при этом образуется не *DYDA*, а продукт желтого цвета, подобный тому, что образует пролин с нингидрином.

Триптофан в реакции с нингидрином также дает более слабое окрашивание, чем большинство других аминокислот. С другой стороны, выход *DYDA* в случае тирозина и фенилаланина во многом зависит от соотношения воды и метилцеллозольва, тогда как более высокий выход в случае лизина, возможно, вызван частичной реакцией нингидрина с концевой аминогруппой.

Метод инфракрасной спектроскопии

В настоящее время широко используется метод инфракрасной спектроскопии. При этом происходит поглощение белками света с определенной длиной волны и измеряется интенсивность его отражения в пробах анализаторах. Приборы предварительно необходимо откалибровать по эталонным образцам (образцам зерна), где концентрация белка уже известна и определена по методу Кьельдаля.

5.2.3 Определение аминокислотного состава пищевых продуктов

В биохимической практике для установления аминокислотного состава белков используют цветные реакции – качественные реакции, обусловленные наличием специфических групп в молекулах белков (табл. 5.3). Некоторые из таких реакций широко используются для количественного определения белков [24].

Таблица 5.3

Цветные реакции белков

Цветная реакция	Специфическая группа	Реагент	Аналитический эффект
Биуретовая реакция	Пептидные связи	Щелочь, CuSO_4	Сине-фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание
Нингидриновая реакция	Аминогруппа в α -положении	Нингидрин	Фиолетовое окрашивание
Реакция Сакагучи	Аргинин	Щелочь, α -нафтол, NaBrO	Красное окрашивание
Реакция Фоля	Цистеин и цистин	Щелочь, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$	Осадок черного или бурого цвета
Ксантопротеиновая реакция	Ароматические аминокислоты	HNO_3 (конц.)	Желтое окрашивание
Реакция Ваузене	Триптофан	NaNO_2 и HCHO	Сине-фиолетовое окрашивание
Реакция Паули	Гистидин и тирозин	Сульфаниловая кислота, NaNO_2 (KNO_2)	Вишнево-красное окрашивание

Аминокислотный состав пищевых продуктов чаще всего определяется методом распределительной хроматографии на бумаге.

Пробоподготовка заключается в выделении связанных аминокислот из белков либо гидролизом белка, либо нагреванием препарата с кислотами (20 %-ный раствор хлороводородной кислоты, 30 %-ный раствор серной кислоты) или основаниями (5 моль/дм³ раствор гидроксида натрия, 14 %-ный раствор гидроксида бария) [24].

Метод распределительной бумажной хроматографии основан на различной растворимости аминокислот в двух частично смешивающихся жидкостях: воде и органическом растворителе. Чем больше растворимость аминокислот в воде и меньше в органическом растворителе, тем медленнее движется аминокислота на бумаге. Показателем скорости движения аминокислоты является величина R_f , являющаяся характерной для каждой аминокислоты и постоянной при данных условиях опыта (растворитель, температура, сорт бумаги и др.).

Неподвижной фазой является вода, носителем неподвижной фазы чаще всего служат силикагель и целлюлоза. Для разделения смеси аминокислот используется растворитель, состоящий из смеси *n*-бутанола, ледяной уксусной кислоты и воды. При работе с растворителем, содержащим бутиловый спирт и ледяную уксусную кислоту, необходимо соблюдать правила техники безопасности. Растворитель обладает резким неприятным запахом, пары его могут вызвать ожоги слизистых.

Положение аминокислот на бумаге определяют с помощью нингидриновой реакции: в присутствии нингидрина отдельные аминокислоты выявляются в виде окрашенных пятен. Качественный состав аминокислот в исследуемом белке определяют, сопоставляя положение пятен веществ-свидетелей с положением пятен анализируемых веществ.

Гидролиз белков для определения аминокислотного состава

Для гидролиза белков обычно используют следующие аналитические операции:

– кислотный гидролиз образцов белка 6 М соляной кислотой при 100 °С в течение 24 и 48 ч, после завершения которого соляную кислоту отгоняют нагреванием до температуры не выше 40 °С, а гидролизат растворяют в буфере или воде. Результаты, полученные для образцов, подвергавшихся гидролизу в течение 24 и 48 ч, экстраполируют к нулевому времени, чтобы получить значения, относящиеся к состоянию перед декомпозицией белков, происходящей в результате кислотного гидролиза, – исключение составляют *Cys*, *Val*, *Met*, *Ile* и *Trp*. В течение 24-часового гидролиза *Val* и *Ile* не полностью высвобождаются из белка, поэтому истинные значения их содержания получают из образца, гидролизованного в течение 48 ч;

– щелочной гидролиз образцов белка в присутствии 5 М гидроксида натрия в течение 16 ч при 110 °С необходим для определения *Trp* и *Leu*. После охлаждения полученного гидролизата его нейтрализуют соляной кислотой и доводят до требуемого объема дистиллированной водой;

– окисление надмуравьиной кислотой и последующий гидролиз образцов белка 6 М соляной кислотой для подготовки к определению *Cys* и *Met*. Надмуравьиную кислоту готовят из 4,5 мл 80 %-ной муравьиной кислоты, к которой добавляют 5 мл 30 %-ного H_2O_2 и нагревают на водяной бане в течение 3 мин при 50 °С. Смесь надмуравьиной кислоты (0,4 мл) и пробы белка (12 мг) нагревают на водяной бане в течение 15 мин при 50 °С и затем выпаривают досуха в ротационном вакуум-перегонном аппарате. Затем осадок гидролизуют 6 М соляной кислотой в течение 22 ч согласно п. 1.

Имеются и другие методы гидролиза белков, характеризующиеся более низкими потерями аминокислот. Например, гидролиз с применением 3-N-меркаптоэтансульфоновой кислоты при 110 °С в течение 22 ч обеспечивает извлечение всех аминокислот, включая триптофан, с большим выходом, чем в случае с применением толуолсульфоновой кислоты или смеси HCl и тиогликолевой кислоты.

Контрольные вопросы

1. Дайте классификацию белкам по структурным признакам.
2. Дайте определение аминокислотному скору и коэффициенту различия аминокислотных скоров.
3. Опишите процедуры извлечения и очистки белков из биологической матрицы.
4. Для чего проводится депротеинизация при пробоподготовке, и какие для этого существуют методы?
5. Опишите основные этапы определения содержания белка в пищевых продуктах по методу Кьельдаля.
6. Дайте характеристику биуретовому методу определения содержания белков в пищевых продуктах.
7. В чем отличия биуретового метода от метода Лоури?
8. Какие еще существуют методы определения количественного содержания белка в пищевых продуктах?
9. Какие качественные реакции используются для определения аминокислот, входящих в состав белков?
10. Каким образом осуществляется определение аминокислотного состава белков?

6 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДОВ В ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ И ПРОДУКТАХ ПЕРЕРАБОТКИ

Липиды чаще всего определяют как группу биоорганических веществ, не растворимых в воде и в различной степени растворимых в органических растворителях, таких как гексан, диэтиловый эфир или хлороформ. Известный специалист в области свойств липидов В. В. Кристи характеризует их следующим образом: «Липиды – это жирные кислоты и их производные, а также вещества, биосинтетически или функционально связанные с этими соединениями» [13]. Обычно сопутствующими веществами в экстрактах липидов выступают стерины, токоферолы и каротиноиды.

Триацилглицерины (ТАГ) являются основными резервными липидами растительных и животных тканей. ТАГ включают жиры (липиды, твердые при 20 °С) и масла (липиды, жидкие при 20 °С). В целом большинство жиров содержатся в животных тканях, а большинство масел – в растительных материалах. На жиры и масла приходится около 40 % энергетической ценности продуктов, потребляемых жителями Западной Европы и Северной Америки, поэтому информация о составе этой группы питательных веществ важна для понимания научных основ правильного питания [13].

Триацилглицерины представляют собой класс липидов, молекулы которых включают глицериновый каркас и специфическую комбинацию трех жирнокислотных остатков. Например, наиболее широко распространенный вид молекулы ТАГ в оливковом масле – это триолеин, состоящий из трехатомного спирта глицерина, все три гидроксила которого этерифицированы олеиновой кислотой (жирной кислотой с 18 атомами углерода и двойной связью между 9-м и 10-м атомами углерода).

При анализе состава пищевых продуктов зачастую определяют содержание «насыщенных», «мононенасыщенных» и «полиненасыщенных» жиров. Насыщенные жиры не содержат двойных связей в жирнокислотных остатках. Для мононенасыщенных жирных кислот характерна одна двойная связь, а полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) содержат две и более двойных связей в молекуле. При определении содержания «насыщенных», «мононенасыщенных» и «полиненасыщенных» липидов гидролизуют эфирные связи ТАГ (и других экстрагируемых липидов), образовавшиеся свободные жирные кислоты верифицируют до их метиловых эфиров, после чего содержание этих эфиров определяют методами газовой хроматографии после чего содержание этих эфиров определяют методами газовой хроматографии (ГХ).

В целом животные жиры характеризуются высоким содержанием насыщенных жирных кислот (точнее, глицеридов, содержащих насыщенные жирные кислоты), а растительные масла – высоким содержанием мононенасыщенных жирных кислот (оливковое масло и масло канола) или

высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (кукурузное и подсолнечное масла).

К числу довольно распространенных неполярных липидов относятся воски (высокомолекулярные алканы, жирные спирты, эфиры жирных кислот и жирных спиртов), диацилглицерины, свободные жирные кислоты и стерины. Широко распространенным стеринном животных тканей является холестерин. В растительных тканях обычно встречаются несколько типов растительных стериннов (фитостериннов). Точный состав фитостериннов чаще всего видоспецифичен. Стерины в биологических объектах могут существовать, имея в молекуле свободную гидроксильную группу. В этом случае они входят в состав биологических мембран наряду с фосфолипидами или представляют собой эфиры, связанные с обычными жирными кислотами.

В составе растительных тканей большая часть стериннов присутствует в виде гликозидов, обычно связанных с остатком глюкозы. Состав стериннов в тканях обычно видо- и тканеспецифичен.

Витамин Е (α -токоферол, и другие изомеры токоферола) и каротиноиды в составе липидных экстрактов также являются минорными компонентами.

Главными структурными липидными компонентами животных и растительных тканей являются фосфолипиды. В числе пяти основных видов фосфолипидов, отличающихся особой фосфорильной «головной группой», – фосфорилхолин, фосфорилэтанолламин, фосфоринозитол, фосфорилглицерин и фосфорилсерин.

Фосфатидилхолин – фосфолипид с фосфорилхолиновой головной группой. Подобно ТАГ, у фосфолипидов имеется глицериновый остов, а в состав каждого вида фосфолипидов (например, фосфатидилхолина) входят различные сочетания двух жирных кислот. Хотя фосфолипиды являются основными структурными липидами клеточных мембран, для стабилизации последних необходимы холестерин и растительные стерины. Другими важными компонентами мембран являются сфингомиелин (в животных тканях), гликосфинголипиды (в растительных и животных тканях) и галактолипиды (только в растительных тканях).

6.1 Методы определения жиров

Во многих странах мира действуют утвержденные методы определения общего содержания жира. Среди наиболее старых методов – непрерывная или полунепрерывная экстракция органическими растворителями с последующим гравиметрическим анализом выделенной липидной фракции. В 1879 г. Франц фон Сокслет спроектировал первый автоматизированный экстракционный аппарат, который в честь изобретателя назвали экстрактором Сокслета. С тех пор появилось несколько модификаций этого аппарата (*Soxhtherm*, *Soxtec*TM, *Butt*, *Goldfish*, *Bailey-Walker*, *Rohrig* и т.д.). Оригинальные экстракторы *Soxhlet* и

экстракторы типа *Butt* не позволяют выполнять одновременный анализ нескольких образцов из-за сложной конструкции стеклянной насадки и длительности экстракции (от нескольких часов до суток).

Большинство липидов, определяющих калорийность жира в пищевых продуктах, относятся к триацилглицеридам (ТАГ), поэтому в методах, предназначенных для определения общего содержания жира, как правило, используют неполярные растворители, селективно экстрагирующие неполярные липиды. Этиловый (диэтиловый) эфир является наиболее предпочтительным растворителем, поскольку он относительно неполярен и хорошо экстрагирует неполярные липиды (например, ТАГ, стерины и токоферолы), при этом отличается плохой экстрагирующей способностью по отношению к полярным липидам (например, гликолипидам и фосфолипидам). В качестве других широко распространенных растворителей для определения липидов используются петролейный эфир и гексан.

Для большинства методов экстракции важным является использование этапа предварительного высушивания навески продукта, поскольку влага препятствует проникновению растворителя вглубь образца и эффективному экстрагированию всех липидных компонентов. Кроме того, эффективность экстракции повышается при уменьшении размера частиц образца пищевого продукта перед экстракцией, что достигается путем размола, дробления или перемешивания. В некоторых пищевых продуктах, например, в молочных, морепродуктах и мясе, липиды находятся в связанном с белками или эмульгированном состоянии, поэтому в соответствующих методах для растворения белков и разрушения эмульсии перед экстракцией используют кислоту или щелочь.

Для анализа содержания жира также используют и другие методы. Метод Бэбкока и Гербера предусматривают обработку пищевых продуктов концентрированной минеральной кислотой для гидролиза белков, а также плавления и высвобождения липидов с последующим определением содержания общего жира весовым способом. Метод Бабкока и его модификации обычно используют для анализа жира в молоке и морепродуктах

Методы экстракции общей липидной фракции

Экстракция общей липидной фракции в пищевых продуктах считается довольно простой процедурой. Тем не менее, разнообразие биологических матриц, характерных для пищевого сырья и готовых пищевых продуктов, а также разнообразие классов липидов влияют на полноту экстракции, возводя ее в ранг задач повышенной сложности.

Для экстракции неполярных и полярных липидов в качестве экстрагентов должны использоваться более полярные растворители (табл. 6.1). Кроме того, многие пищевые продукты растительного и животного происхождения характеризуются высокими уровнями содержания влаги, поэтому методы

экстракции должны учитывать присутствие эндогенно-связанной влаги.

Таблица 6.1

Методы, предназначенные для рутинного анализа липидов в составе пищевых продуктов и использования экстракта для последующих определений отдельных липидных компонентов

Метод	Растворители	Типы экстрагируемых липидов
Модификации метода Сокслета	Гексан или петролейный эфир	Неполярные липиды
Сверхкритическая флюидная экстракция	СО ₂ , иногда с этиловым спиртом	Неполярные липиды
Фольча	Хлороформ, метанол и вода	Неполярные и полярные липиды
Блая и Дайера	Хлороформ, метанол и вода	Неполярные и полярные липиды
Хара и Радина	Гексан, изопропанол и вода	Неполярные и полярные липиды
Ускоренная экстракция растворителем	Гексан	Неполярные липиды
	Этанол или изопропанол	Полярные и неполярные липиды

Наиболее популярным методом экстракции общей липидной фракции является метод Фольча. Липиды экстрагируют из образца (1 г) 20 мл смеси хлороформа с метанолом (2:1 по объему). Связанная вода в образце образует третий растворитель в монофазной экстракционной смеси. После экстракции добавляют еще одну пятую объема воды или раствора соли (0,29 %), смесь встряхивают и затем приводят в равновесное состояние. В результате образуются две фазы: нижняя фаза представляет собой смесь хлороформ-метанол-вода в соотношении 86:14:1, содержащую практически все липиды, а верхняя фаза состоит из тех же растворителей в пропорции 3:48:47 и содержит большинство нелипидных компонентов. Этот метод работает лучше всего при общем соотношении трех растворителей (хлороформ-метанол-вода) 8:4:3.

Метод, разработанный Блаем и Дайером, предназначен для экстракции липидов из тканей рыб, однако его использовали для экстракции липидов из разнообразных животных и растительных тканей. Метод предусматривает экстрагирование из тканей смесью хлороформ-метанол-вода в соотношении 1:2:0,8. После экстракции монофазной смесью растворителей добавляют одну часть хлороформа и одну часть воды (или 0,88 %-ного раствора хлористого

калия), перемешивают, и после достижения равновесного состояния (которое можно ускорить центрифугированием) липиды концентрируются в нижней фазе.

Экстрактор фирмы *Dionex* (г. Саннивейл, штат Калифорния, США), разработанный в 2001 г. и названный *Accelerated Solvent Extractor (ASE®)*, предназначен для экстракции липидов из большого количества твердых или полутвердых образцов (1-100 г) с использованием воды или органических растворителей при повышенных температурах (до 200 °С) и давлении (до 100 бар). Проведено сравнительное исследование липидов различных классов, которые экстрагировали на аппарате *ASE®* из молодой кукурузы и молодого овса гексаном, хлористым метилом, изопропанолом или этанолом.

Так как некоторые растительные ткани содержат весьма активные липолитические ферменты, расщепляющие липиды, их действие можно минимизировать, вымачивая растительную ткань в горячем изопропаноле перед экстракцией хлороформ-метанольной смесью. Недавно разработан вариант этого метода для серийных анализов большого количества образцов растительной ткани с последующим анализом липидных классов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Учитывая токсичность хлороформа, разработаны методы, использующие менее токсичные растворители, например, гексан-изопропанол. Метод экстракции смесью гексан-изопропанол применяли в 1980-х гг. для проведения многочисленных исследований, но перед серийным использованием этого метода для новых типов растительных и животных тканей его следует тщательно проверить.

Метод разделения и количественного анализа интактных липидных классов, т. е. неповрежденных, не вовлеченных в какой-либо процесс

Разделение липидных классов часто требует подготовки образцов к последующему анализу их жирокислотного состава. Точный количественный анализ липидных классов позволяет также получить ценную информацию об их структуре и физиологической активности. Некоторые относительно простых методов позволяют выделить липидные классы из экстрактов общей липидной фракции, используя хроматографию на открытых колонках (работающих при низком давлении).

Описан метод, предназначенный для разделения неполярных липидных классов (углеводороды, эфиры холестерина, ТАГ, холестерин, диацилглицерины и моноацилглицерины) из липидного экстракта с использованием колонки, заполненной силикагелем, и последовательного элюирования фракций 0-100 %-ным диэтиловым эфиром в гексане (табл. 6.2).

Набивные колонки для твердофазной экстракции (ТФЭ), уже заполненные различными сорбентами, широко распространены и легко доступны. Известен метод последовательного разделения десяти липидных классов и использованием ТФЭ-картриджа с силикагелем.

Таблица 6.2

Методы разделения и количественного анализа интактных липидных классов

Метод	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Разделяемые классы липидов
Жидкостная хроматография на открытых колонках (ЖХ низкого давления)	Силикагель	Гексан-диэтиловый эфир	УВ, ЭХ, ТАГ, холестерин, ДАГ, МАГ
Твердофазная экстракция	Силикагель	Восьми ступенчатая смесь растворителей	ЭХ, ТАГ, холестерин, ДАГ, СЖК, ФИ
ТСХ неполярных липидов	Силикагель	Гексан, эфир, муравьиная кислота в соотношении 80:20:2	ЭХ, ТАГ, СЖК, холестерин, ДАГ, МАГ
ТСХ полярных липидов	ЯР-силикагель	Диизобутилкетон, уксусная кислота, вода в соотношении 40:25:3:7	МГДГ, СГ, ФЭА, ДГДГ, ФХ, ФИ
ВЭЖХ СЖК и МЭЖК	Ультрасфера <i>ODS</i>	Метанол, вода, уксусная кислота, градиент состава	Распространенные СЖК и МЭЖК
ВЭЖХ гидрокси- и эпоксипроизводные жирных кислот	Силикагель	Гексан, изопропанол, уксусная кислота, градиентный режим	Распространенные гидрокси- и эпоксипроизводные СЖК

Обозначения: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ДАГ – диацилглицериды; ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерин; ЖХ – жидкостная хроматография; МАГ – моноацилглицериды; МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин; МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот; СЖК – свободные жирные кислоты; СЭК – стерильные эфиры коричной кислоты; ТАГ – триацилглицерины; ТСХ – тонкослойная хроматография; УВ – углеводороды; ФГ – фосфатидилглицерин; ФИ – фосфатидилинозитол; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; ЭХ – эфиры холестерина.

Популярным методом для предварительного фракционирования или разделения липидных классов долгое время была тонкослойная хроматография (ТСХ). В настоящее время большинство аналитиков используют хроматографические пластины с готовым покрытием, что обеспечивает большее удобство и лучшую воспроизводимость. Хотя некоторые ученые полагали, что ВЭЖХ заменит ТСХ, последняя имеет некоторые важные преимущества: 1) этот метод не нуждается в дорогостоящем оборудовании; 2) селективные распыляемые реагенты позволяют получить очень ценную информацию о структуре.

Методы ТСХ, применяемые для разделения неполярных и полярных липидов, перечислены в табл. 6.2. Хотя большинство аналитиков используют одномерную ТСХ, иногда необходимо использовать двухмерную ТСХ с разными смесями растворителей для каждого измерения, чтобы улучшить разделение смесей липидов различных классов. В некоторых случаях возможно также разделение неполярных и полярных липидов методом одномерной хроматографии с использованием двухстадийного разделения в одном и том же направлении, но с двумя различными смесями растворителей.

Описания методов анализа липидов с использованием ВЭЖХ публикуются с 1980-х гг. УФ-детектирование (при 205-210 нм) является достаточно чувствительным способом обнаружения ненасыщенных липидов, однако количественное УФ-детектирование связано с большими трудностями, поскольку отклик детектора пропорционален общему количеству двойных связей углерод-углерод в молекулах липидов. Кроме того, УФ-детектор не регистрирует насыщенные липиды.

В середине 1980-х гг. были изобретены два типа «масс-детекторов»: пламенно-ионизационный детектор (*FID*) и испарительный детектор светорассеяния (*ELSD*). *FID* продавался только в течение нескольких лет, но несколько производителей продолжали улучшать и совершенствовать *ELSD*, что привело к тому, что эти детекторы стали незаменимыми для анализа липидных компонентов. Было разработано несколько методов ВЭЖХ-*ELSD* для количественного анализа неполярных и полярных липидов.

Определение массовой доли жира в продуктах питания

Массовая доля жира пищевых продуктов всегда вызывала интерес как с технологической точки зрения, так и в концепции сбалансированного питания.

На практике широкое распространение получили методы количественного определения жиров, которые по способам анализа принято делить на две группы: 1) методы определения массовой доли жира непосредственно в объекте и 2) методы, связанные с предварительным извлечением жира.

Для определения жира без извлечения из матрицы пищевого материала используют такие аналитические методы, как метод ядерного магнитного резонанса, ИК-спектроскопия, турбидиметрия, ультразвук и др.

При определении содержания жира непосредственно в биологическом материале основываются на свойстве липидов хорошо растворяться в неполярных органических растворителях, а также их смесях.

Данная группа методов основывается на массопереносе липидов на первом этапе в фазу органического растворителя, после чего в полученном экстракте определяют содержание жира гравиметрическим или другим способом.

Липиды в пищевом матриксе могут находиться как в свободном состоянии, так и в виде комплексов различной прочности с другими веществами, в том числе с белками и углеводами. При свободном состоянии жиры легко переходят в экстракт при использовании неполярных растворителей. Связанные жиры экстрагируют смесью растворителей, которая обычно содержит этиловый спирт. Общее количество жира (жир-сырец) чаще извлекают смесью диэтилового эфира и этанола или, реже, хлороформа и метанола, хотя метанол будет обеспечивать более количественное извлечение жира из продукта. Это связано с высокой токсичностью метанола и его высокой стоимостью. Для разрыва прочных связей

липидов с другими соединениями пищевой матрикс предварительно гидролизуют щелочами или кислотами.

В основе определения липидов гравиметрическим методом лежит его многократное извлечение органическим растворителем из предварительно высушенной навески образца с последующим этапом удаления растворителя и определением массы анализируемого жира. Для экстракции липидной фракции используют аппарат Сокслета, который состоит из эксикатора, куда помещают бумажный патрон с предварительно подготовленной пробой, холодильника и экстракционной колбы. Извлечение обычно проводят петролевым или серным эфиром, а также углеводородные растворители (дихлорэтан, хлороформ и др.).

В процессе проведения экстракции растворитель вместе с растворенным в нем жиром стекает в экстракционную колбу. Жир остается в колбе, а пары растворителя вновь поднимаются и экстрагируют новую порцию. Таким образом, исследуемый объект, подвергаясь многократной экстракции, полностью обезжиривается. Ориентировочная продолжительность экстракции 6-8 ч [16].

По завершении процесса экстрагирования патрон извлекают из экстрактора, высушивают и взвешивают. Количество сырого жира определяют по разности между массой патрона с материалом до экстрагирования и после нее по формуле 6.1

$$\omega = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \cdot 100 \%, \quad (6.1)$$

где ω – содержание жира, %; m_1 – масса патрона с материалом до экстрагирования, г; m_2 – масса патрона с материалом после экстрагирования, г; m_0 – масса навески, г.

Содержание жира сырца также определяют путем взвешивания экстракционной колбы с выделенным жиром с предварительно удаленным растворителем. В этом случае массовую долю жира в продукте вычисляют по аналогичной формуле, где m_1 – масса колбы с жиром; г; m_2 – масса пустой колбы, г.

В жидких продуктах, таких как молоко, массовая доля жира навески рассчитывается по формуле 6.2

$$m_0 = V \cdot \rho, \quad (6.2)$$

где V – объем пробы, взятой для анализа, см³; ρ – плотность, г/ см³.

Метод Гербера

Метод основан на гидролизе белков анализируемого образца концентрированной серной кислотой и экстракции жира изоамиловым спиртом. В процессе реакции между изоамиловым спиртом и серной кислотой получается сложный эфир, который снижает поверхностное натяжение раствора, таким образом способствуя выделению жира. Для лучшего отделения данную смесь

центрифугируют в бутирометрах (жиромерах), а отделившийся липидный слой определяют по градуированной шкале.

Различают молочные и сливочные жиромеры, которые различаются друг от друга размером и ценой деления градуировочной шкалы. Цена деления в молочных жиромерах соответствует 1 %, что равняется 0,011332 г жира. Для сливочных жиромеров – объем двух делений соответствует 1 % жира в образце навеской 5 г. Их применяют при определении жира в продуктах, содержание которого превышает 10 %.

Методом Гербера можно количественно определять липиды в следующих продуктах: молоко и молочные продукты, творог, полуфабрикаты из мяса, мучные кондитерские изделия, сухие продукты детского и диетического питания.

Определение жирокислотного состава пищевых продуктов

Жирокислотный состав сырья и пищевых продуктов можно определить методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ), который характеризуется высокой чувствительностью, разделительной способностью, экспрессностью. Этот метод является универсальным, что дает возможность идентифицировать и количественно определять индивидуальные соединения многокомпонентных смесей.

Пробоподготовку растительного сырья проводят по ГОСТ 29033.

Время удерживания жирных кислот имеет высокие значения, поэтому они претерпевают предварительную модификацию с образованием метиловых эфиров, коэффициент распределения которых значительно выше за счет их более высокой летучести. Пробоподготовку в этом случае проводят следующим образом: навеску липида растворяют в органическом растворителе, прибавляют раствор метилата натрия в метаноле. Далее полученную реакционную смесь отфильтровывают для удаления образовавшегося глицерина, а образовавшейся фильтрат используют для хроматографического анализа.

Условия хроматографирования: твердый носитель – хроматон N-AW (или инвертон), представляющий собой обработанный хлороводородной кислотой диатомит; неподвижная жидкая фаза – полиэтиленгликоль сукцинат; подвижная фаза – азот; рабочая температура колонки – 170 °С; пламенно-ионизационный детектор [14].

Определение веществ осуществляется по относительному времени удерживания $t_{отн}$. При одинаковых условиях хроматографирования эти значения будут идентичны (см. табл. 6.3).

Таблица 6.3

Относительное время удерживания метиловых эфиров жирных кислот при 170 °С [14]

Обозначение кислоты	Название кислоты	$t_{отн}$
12 : 0	Лауриновая	0,12
13 : 0	Тридециловая	0,17
14 : 0	Миристиновая	0,23

14 : 1 (9)	Миристоолеиновая	0,29
15 : 0	Пентадециловая	0,32
16 : 0	Пальмитиновая	0,45
16 : 1 (9)	Пальмитоолеиновая	0,55
16 : 2 (6, 9)	Гексадекадиеновая	0,66
16 : 3 (6, 9, 12)	Гексадекатриеновая	0,88
17 : 0	Маргариновая	0,62
18 : 0	Стеариновая	0,86
18 : 2 (9, 12)	Линолевая	1,27
18 : 3 (6, 9, 12)	γ -Линоленовая	1,51
18 : 3 (9, 12, 15)	α -Линоленовая	1,73
18 : 4 (6, 9, 12, 15)	Стиоридовая	2,06
19 : 0	Нонадециловая	1,18
20 : 0	Арахидовая	1,63

Процентное содержание жирных кислот в фильтрате определяют методом нормировки.

Количественный анализ молекулярных видов распространенных липидных классов методами ВЭЖХ

Для разделения молекулярных видов ТАГ разработано несколько методов обращенно-фазовой ВЭЖХ (табл. 6.4).

Таблица 6.4

Количественный анализ молекулярных видов распространенных липидных классов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

Липидный класс	Колонка	Подвижная фаза	Источник липидов
Триацилглицерины	<i>Inerisil ODS</i>	Ацетонитрил-дихлорметан, градиентный режим	Кукурузное масло
Фосфолипиды	<i>BondpackC18</i>	Метанол, вода, ацетонитрил (90,5:7:2,5), изократический режим	Растительный фосфатидилхолин
Эфиры фитостеринов	<i>Zorbax ODS</i>	Ацетонитрил, изопропанол (60:40), изократический режим	Кукурузное масло
Растительные галактолипиды	<i>LunaC18</i>	Метанол, вода (98:2), изократический режим	Паприка
Растительные ацилированные стерилглицозиды	<i>Luna C18</i>	Метанол, этанол (3:2), изократический режим	Паприка
Растительные стерилглицозиды	<i>Prevail C183 мкм</i>	Метанол, вода (96:4), изократический режим	Биотопливо

Перед введением пробы в систему ВЭЖХ необходимо получить чистые ТАГ методами ТСХ или ВЭЖХ для липидных классов. Если смеси липидов чрезвычайно сложны (как в случае рыбьего жира), ТАГ иногда предварительно разделяют на несколько фракций, используя сереброионную хроматографию, которая позволяет фракционировать липиды, основываясь на общем количестве двойных связей углерод-углерод, после чего каждую из этих фракций вводят в хроматограф по отдельности, чтобы получить несколько более простых хроматограмм молекулярных видов

Кроме того, разработано несколько методов для разделения молекулярных видов различных классов фосфолипидов. После очистки индивидуального класса фосфолипидов (например, фосфатидилхолина), молекулярные виды данного фосфолипидного класса подобным образом разделяют с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Разработаны методы для разделения молекулярных видов других липидных классов, в том числе стерильных эфиров, растительных галактолипидов, растительных ацилированных стерилглюкозидов и растительных стерилглюкозидов.

6.2 Способы измерения степени окисления липидов

В процессе окисления липидов образуются многочисленные продукты окисления отдельных жирных кислот. Эти продукты зачастую содержат двойные связи и (в некоторых случаях) неповрежденные пентадиеновые системы. Такие системы двойных связей могут подвергаться дальнейшим воздействиям с отрывом атомов водорода либо атакам синглетного кислорода. Все это приводит в результате к образованию дополнительных продуктов расщепления. Поскольку в пищевых жирах и маслах содержатся многочисленные ненасыщенные жирные кислоты, и они могут подвергаться действию нескольких разных прооксидантов, то возможно образование сотен продуктов расщепления. Из-за сложности этих последовательных химических реакций анализ окисления липидов существенно затрудняется. Далее мы вкратце рассмотрим наиболее распространенные методы анализа продуктов окисления пищевых жиров и масел.

6.2.1 Органолептический анализ

Органолептический анализ – это своего рода «золотой стандарт» определения степени окисления липидов, поскольку это единственный способ, который непосредственно отслеживает образование побочных привкусов и запаха в результате реакций окисления [11]. Кроме того, органолептический анализ – это довольно чувствительный метод, поскольку человек способен обнаруживать определенные вкусоароматические соединения при их содержании ниже или близко к порогу обнаружения химическими и инструментальными

методами. Органолептический анализ степени окисления липидов должен проводиться специально подготовленными людьми. Такое обучение обычно специфично для каждого пищевого продукта, поскольку продукты окисления различных жирных кислот могут характеризоваться разными органолептическими профилями. Из-за необходимости профессиональной подготовки органолептический анализ зачастую требует длительного времени, обходится очень дорого и обычно не подходит для ускоренного всестороннего анализа при контроле качества. Этим во многом и было обусловлено появление многих химических и инструментальных методов анализа, которые приносят наибольшую пользу, если их результаты коррелируют с данными органолептического анализа. Для выявления окислительной порчи пищевых продуктов существуют многочисленные тесты, наиболее распространенные из которых с их преимуществами и недостатками мы рассмотрим далее.

6.2.2 Первичные продукты окисления

Первичные продукты окисления липидов – это соединения, образованные на стадиях начала и развития окисления. Поскольку это первые продукты окисления, то в ходе окислительного разложения липидов они возникают довольно рано, и на более поздних стадиях окисления концентрация этих соединений снижается по мере замедления скорости их образования по сравнению со скоростью расщепления. Недостаток использования первичных продуктов окисления для измерения степени окисления состоит в том, что они нелетучи и поэтому не участвуют непосредственно в образовании побочных вкусов и запахов. Кроме того, в определенных условиях (при высоких температурах жарочных жиров или при высоком содержании реакционноспособных переходных металлов) концентрация этих первичных продуктов окисления может слегка увеличиваться и при высоких скоростях их расщепления. Это приводит к ложным результатам, так как даже в очень прогорклom масле содержание первичных продуктов окисления может быть очень невелико.

6.2.3 Конъюгированные двойные связи

На стадии начала окисления в полиненасыщенных жирных кислотах при отрыве атома водорода быстро образуются конъюгированные двойные связи. Конъюгированные диены характеризуются максимальным светопоглощением при длине волны 234 нм с молярным коэффициентом экстинкции $2,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. По сравнению с другими методами дает средний уровень чувствительности. Конъюгированные диены полезны в случае простых жировых систем, но зачастую неэффективны в сложных пищевых системах с многочисленными соединениями, которые также поглощают свет при близких длинах волн и тем самым являются причиной помех. Иногда содержание конъюгированных диенов

и гидропероксидов липидов используют взаимозаменяемо, поскольку многие гидропероксиды липидов содержат конъюгированные диеновые системы. Вместе с тем следует воздерживаться от использования этой эквивалентности, если продукты разложения жирных кислот могут содержать конъюгированные двойные связи и если мононенасыщенные жирные кислоты (например, олеиновая) образует гидропероксиды без конъюгированной диеновой системы. Содержание в пищевых продуктах конъюгированных триенов можно измерить при длине волны 270 нм. Этот метод пригоден только для липидов с более чем тремя двойными связями и поэтому ограничен высоконенасыщенными жирами и маслами, например, льняным маслом и рыбьим жиром.

6.2.4 Гидропероксиды липидов

Очень распространенным способом определения степени окисления липидов является измерение содержания гидропероксидов жирных кислот. Большинство используемых методов основаны на способности гидропероксидов окислять некое соединение-индикатор. Содержание пероксида выражают в миллиэквивалентах (мэкв) кислорода на 1 кг жира (масла) причем 1 мэкв соответствует 2 ммоль гидропероксида. В наиболее распространенном методе титрования используется инициирование гидропероксидом превращение йодида в йод. Йод затем титруют тиосульфатом натрия с образованием йодида, количество которого измеряют с использованием в качестве индикатора крахмала. Этот метод относительно нечувствителен с пределом обнаружения 0,5 мэкв/кг жира и может требовать до 5 г липида. На практике его используют только для отделенных или жидких жиров и масел. Кроме того, можно использовать активированное гидропероксидом липида окисления иона двухвалентного железа до трехвалентного, причем ионы трехвалентного железа обнаруживаются с помощью тон-специфических хромофоров типа тиоцианата или диметилфенола оранжевого. Эти методы намного более чувствительны, чем метод титрования йода тиосульфитом натрия. Хромофор, образующийся из комплекса «тиоцианат-железо III», имеет коэффициент экстинкции $4,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, позволяющий проводить анализ с миллиграммовыми количеством жиров.

6.2.5 Вторичные продукты окисления

Вторичные продукты окисления липидов – это соединения, образующиеся при разложении гидропероксидов жирных кислот посредством реакций типа β -расщепления. Как мы уже отмечали, в процессе окисления пищевых жиров могут образовываться сотни различных летучих и нелетучих соединений. Поскольку теоретически невозможно определить все эти соединения одновременно, используемые методы определения обычно направлены на анализ одного соединения или некоторого класса соединений. Недостаток таких методов

состоит в том, что в результате разложения гидропероксидов липидов происходит образование вторичных продуктов, и в некоторых случаях (например, в присутствии антиоксидантов) концентрации вторичных продуктов могут быть малыми, а первичных продуктов окисления – высокими. Кроме того, соединения, содержащие amino- и сульфгидрильные группы (например, белки), могут взаимодействовать со вторичными продуктами реакции, содержащими такие функциональные группы, как альдегиды, что затрудняет их определение. Преимуществом этих методов является то, что с их помощью можно определить содержание многих продуктов разложения жирных кислот, которые непосредственно ответственны за побочные привкусы и запахи прогорклых жиров, и поэтому их результаты лучше коррелируют с данными органолептического анализа.

6.2.6 Анализ летучих вторичных продуктов окисления

Летучие продукты окисления липидов обычно определяют методом газовой хроматографии с использованием прямого инжектирования, статического или динамического анализа паровой фазы над жидкостью или твердофазной микроэкстракции (*SPME*). При использовании этих систем степень окисления липидов можно определить по содержанию специфических продуктов окисления, например, гексаналя (для липидов с высоким содержанием ω -6 жирных кислот) и пропаналя (для липидов, богатых ω -3 жирными кислотами), по содержанию определенных классов продуктов окисления (например, углеводов или альдегидов), а также по общему содержанию летучих соединений, используемых в качестве индикаторов. Каждый из этих методов может давать для одного и того же продукта разные профили летучих соединений, что определяется различиями в способности каждого метода выделять и собирать летучие вещества из исследуемого образца. Преимуществом определения летучих продуктов окисления липидов является хорошая корреляция с данными органолептического анализа, а недостатком – высокая стоимость оборудования и сложности с анализом большого количества образцов (особенно для быстроокисляющихся липидов), поскольку для анализа требуется много времени. Кроме того, в этих методах зачастую необходима стадия нагревания для повышения концентрации летучих соединений в воздушном пространстве над образцом. Для некоторых пищевых продуктов, в частности мяса, эти стадии нагревания могут увеличить скорость окисления липидов из-за тепловой обработки продукта. В общем случае образцы липидов следует отбирать при наименьшей возможной температуре. Еще одна проблема – это потеря летучих соединений в жарочных жирах в ходе перегонки с водяным паром.

6.2.7 Карбонильные соединения

Карбонилы, образующиеся в результате окисления липидов, можно

определить путем реакции липидов с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием соответствующих гидразонов, поглощающих свет в диапазоне длин волн 430-460 нм. Этот метод имеет определенные ограничения из-за присутствия пищевых продуктов карбонильных соединений, создавая помехи. Для отделения карбониллов, образующихся при окислении липидов, от соединений-«помех» разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), но он довольно сложен и требует много времени, в связи с чем при рутинных анализах пищевых липидов его не применяют.

Содержание карбонильных соединений можно определить также путем их соединения с анизином (метоксианилином) с образованием продуктов, которые поглощают с длиной волны 350 нм. Этот метод весьма полезен, поскольку позволяет определять содержание нелетучих высокомолекулярных карбонильных соединений, что делает его пригодным для анализа жарочных жиров, в которых летучие продукты окисления теряются в результате перегонки с водяным паром. Кроме того, анизидин применяют также для определения степени окисления липидов в рыбьем жире, поскольку в ходе очистки его обычно подвергают активной перегонке с водяным паром. Еще одно преимущество анизидинового теста при анализе рыбьего жира – это возможность определить качество жира до перегонки с водяным паром, поскольку в нем остаются нелетучие высокомолекулярные соединения.

6.2.8 ТБК-тест (тиобарбитуровой кислоты)

ТБК-тест основан на реакции между тиобарбитуровой кислотой и карбонилами с образованием в кислой среде красных флуоресцирующих аддуктов. Анализировать можно исходные образцы, их экстракты или дистилляты. Дополнительная информация может быть получена посредством варьирования контрольных температур (25-100 °С) и времени (от 15 мин до 20 ч). К первичным продуктам окисления липидов зачастую относят другие соединения, выявляемые ТБК-тестом, которые на самом деле являются малоновыми диальдегидами (МДА), чьи аддукты сильно поглощают при длине волны 532 нм. МДА – это диальдегид, получаемый в результате двухступенчатого окислительного разложения жирных кислот с тремя и более двойными связями. Это означает, что выход МДА в ходе окисления липидов зависит от жирнокислотного состава, причем более ненасыщенные жирные кислоты дают больше МДА. ТБК может реагировать и с другими альдегидными продуктами окисления липидов, особенно с ненасыщенными альдегидами.

Недостатком ТБК-теста является его неспецифичность, поскольку ТБК способна реагировать с нелипидными карбонильными соединениями – аскорбиновой кислотой, сахарами и продуктами реакций неферментативного потемнения. Эти соединения могут образовывать с ТБК аддукты, поглощающие в диапазоне длин волн 450-540 нм. Зачастую определяют все способные к реакции

с ТБК вещества (*TBARS*, соединения, химически активные в реакции с 2-ТБК), которые, как и МДА, могут образовывать розовые хромофоры. Чтобы уменьшить проблемы с соединениями-«помехами», комплексы ТБК-МДА следует определять непосредственно по флуоресценции или ВЭЖХ-методами.

ТБК-тест полезен для определения степени окисления липидов, поскольку он прост и недорог, однако его неспецифичность требует понимания ограничений, чтобы не получить ошибочных выводов. Для минимизации потенциальных ошибок в интерпретации результатов ТБК-теста следует проводить контрольный анализ свежих, неокисленных образцов. Это позволит количественно определить способные к реакции с ТБК соединения, содержание которых в процессе окисления липидов не увеличивается. Тем не менее, ТБК-тест необходимо исключить для пищевых продуктов с высоким содержанием соединений-«помех». Кроме того, не следует пытаться использовать ТБК-тест для сравнения окислительных изменений в пищевых продуктах с различным жирнокислотным составом, поскольку содержание МДА в зависимости от состава жирных кислот меняется.

6.3 Липидомика – новая область анализа липидов

Липидомика – новейшая область исследований, которая появилась в последние 10 лет, после быстрого развития двух других «омик» – геномики (1980-е гг.) и протеомики (1980-е гг.).

Что такое липидомика? Разные эксперты дают различные определения. Согласно Спенеру и Лагадру – это «полная характеристика молекулярных видов липидов и их биологической роли в экспрессии белков, вовлеченных в липидный обмен, и функции, включая генное регулирование». Молекулярные виды – это определенные молекулы липидов, например, триолеин в оливковом масле и *PC 36:4* (фосфатидилхолин, содержащий в клеточных мембранах жирные кислоты с 36 углеродами и 4 двойными связями). Липидный класс – группа молекулярных видов липидов со сходными характеристиками (например, ТАГ, фосфатидилхолин и свободные стерины).

Некоторые эксперты полагают, что липидомика – высокотехнологичное название для профилирования липидов или высокопроизводительного профилирования липидов. Хотя для получения данных для липидомики могут применяться традиционные аналитические методы, такие как ГХ и ВЭЖХ, большинство последних липидомических данных получают при использовании мощных масс-спектрометрических методов (обычно МС/МС), а анализ и архивизация данных проводится с помощью специализированного программного обеспечения, подобного тому, что используется для геномики и протеомики.

В настоящее время для анализа липидов используются различные методы. При этом аналитик должен выбирать метод, наиболее подходящий для конкретного применения. Многие современные методы анализа липидов

объединили в себе последние достижения в области электроники и информатики (особенно в области сбора, анализа и интерпретации данных), однако некоторые «низкотехнологичные» аналитические методы, такие как ТФЭ и ТСХ, до сих пор могут давать ценную информацию при скромных затратах труда и времени.

Контрольные вопросы

1. Дайте классификацию липидам по структурным признакам.
2. Опишите процесс экстракции общей липидной фракции.
3. Какие две основных группы методов количественного определения жира в сырье и пищевых продуктах применяются на сегодняшний день?
4. В чем заключается метод Гербера?
5. Каким образом проводят определение жирокислотного состава пищевых продуктов?
6. Что происходит с жиром в процессе его порчи? Каким образом он разрушается, и какие соединения образуются?
7. Какой показатель определяет йодное число?
8. Дайте определение понятию «липидомика».

7 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ УГЛЕВОДОВ В СЫРЬЕ И ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Углеводы – наиболее распространенный класс природных органических соединений. По химическому составу углеводы представляют собой соединения, состоящие из углерода, водорода и кислорода и имеющие общую формулу $C_nH_{2n}O_n$. Классификация представлена тремя подклассами углеводов. Различают моно-, олиго- и полисахариды.

Углеводы являются основным источником энергии в рационе человека, обеспечивая от 40 до 80% общей потребности в энергии. Углеводы поставляют энергию для всех функциональных систем организма, особенно мозга. Кроме того, углеводы принимают участие в метаболизме других питательных веществ. Важная роль углеводов в физиологии человека обусловлена их влиянием на насыщение и опорожнение желудка, микробиоту толстой кишки и желудочно-кишечные процессы, включая перистальтику и процессы брожения, а также на регулирование содержания глюкозы в крови и метаболизм инсулина и холестерина сыворотки крови.

Основные источники углеводов – это зерновые, овощи, фрукты, рис, картофель, бобы и мучные продукты. Моносахариды, дисахариды и полисахариды присутствуют во всех овощах. Углеводы синтезируются не только в зеленых растениях, но и в животных, где они усваиваются сразу либо запасаются в виде гликогена. Углеводы синтезируются в организме из некоторых аминокислот и глицеринового компонента жиров. Сахара дополнительно добавляют в пищевые продукты в процессе производства или приготовления пищевых продуктов, в основном для улучшения их органолептических свойств.

Нутрициологи и диетологи разделяют пищевые углеводы на два класса. Первый из них – доступные, то есть легко усваиваемые и метаболизируемые углеводы, в частности, моно-, ди- и полисахариды (глюкоза, фруктоза, лактоза, декстрин и крахмал). Второй класс составляют неусваиваемые углеводы, которые в исходном виде не усваиваются. Симбиотические бактерии расщепляют эти углеводы до жирных кислот, в связи с чем неусваиваемые углеводы не являются источником углеводов для организма человека. К этому классу относятся структурные полисахариды стенок растительных клеток и многие сложные полисахариды, в том числе целлюлоза, пектин и β -глюканы. Другими словами, доступные углеводы гидролизуются ферментами желудочно-кишечного тракта, а недоступные (сахарные спирты, многие олигосахариды и некрахмальные полисахариды) не гидролизуются эндогенными ферментами, но могут ферментоваться микроорганизмами в толстой кишке и затем частично усваиваться.

Сахара (глюкоза, сахароза, фруктоза, лактоза и мальтоза), полиолы (сорбит и маннит), олигосахариды – галактоолигосахариды (ГОС) и фруктоолигосахариды

(ФОС) полисахариды (крахмал и некрахмальные полисахариды) считаются основными классами углеводов, значимыми для питания человека. Сбраживаемые низкомолекулярные углеводы (олиго-, ди- и моносахариды, полиолы) плохо всасываются в тонкой кишке, оказывают неоднозначное влияние на состояние желудочно-кишечного тракта. Эта группа углеводов присутствует в широком спектре пищевых продуктов [19].

7.1 Классификация и строение углеводов

Простые углеводы. Моно- и дисахариды

Моносахариды не нуждаются в переваривании и способны всасываться и поступать прямо в кровоток. Все моносахариды синтезируются в организме. Моносахариды, среди которых наиболее важными с точки зрения питания являются глюкоза, фруктоза и галактоза, являются основными функциональными углеводами. Структура фруктозы показана на рис. 7.1. Фруктоза, будучи основным компонентом фруктов, фруктовых соков, меда и кукурузного сиропа, является важнейшим углеводным компонентом рациона.

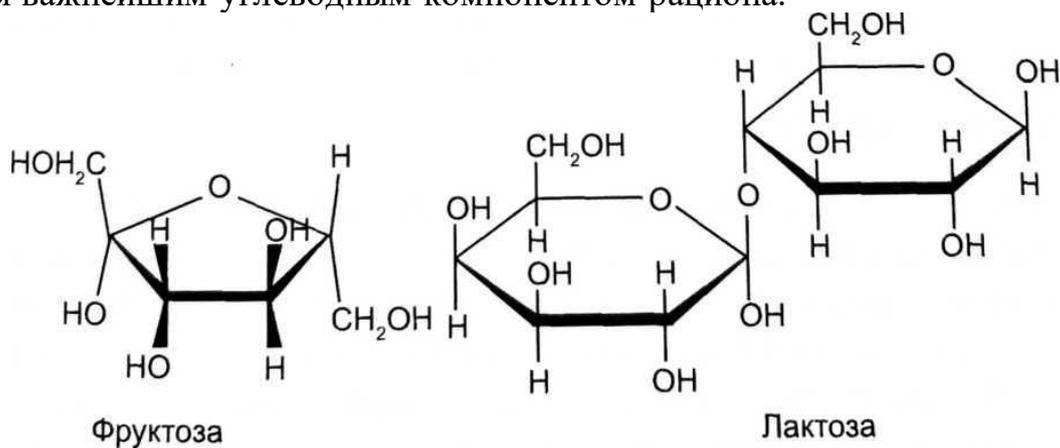


Рис. 7.1. Структура моно- и дисахаридов

Дисахариды состоят из двух моносахаридных остатков. Важными для питания являются сахароза (димер глюкозы и фруктозы), лактоза (димер глюкозы и галакто и мальтоза (димер двух глюкозных остатков). Лактозу (рис. 7.1) также относят к сбраживаемым низкомолекулярным углеводам.

Полиолы

Полиолы (сахарные спирты) получают восстановлением альдоз и кетоз. Полиолы представляют значительный интерес как пищевые добавки, поскольку их можно использовать в качестве низкокалорийных подсластителей. Информации о содержании полиолов в пищевых продуктах в литературе недостаточно, однако известно, что маннит присутствует в некоторых овощах (сельдерей, морковь, петрушка, тыква, лук, салат эндивий и спаржа); сорбит содержится во многих фруктах. Некоторые ученые предлагают использовать маннит и сорбит в качестве индикаторов подлинности пищевых продуктов.

Олигосахариды

Встречающиеся в пищевых продуктах многочисленные олигосахариды, содержащие от трех до пяти моносахаридных единиц, в целом являются неусваиваемыми. Олигосахариды представляют собой углеводы, образованные из 2-10 молекул основных сахаров. Фруктаны и ФОС (например, нистоза и кестоза), а также ГОС (например, рафиноза и стахиоза) считаются пребиотическими углеводами. ФОС и некрахмальные полисахариды играют важную роль как пищевые волокна.

Фруктаны в значительных количествах содержатся в чесноке, топинамбуре и луке. Среди всех культивируемых растений наибольшая концентрация ФОС обнаружена в топинамбуре. В Японии ФОС использовались как пищевые добавки с 1990-х гг. В настоящее время они становятся все более популярными на Западе ввиду наличия пребиотических эффектов. ФОС являются субстратом для микробиоты толстой кишки, улучшая общее состояние желудочно-кишечного тракта. Кроме того, установлено, что ФОС и инулин (природный полисахарид) способствуют всасыванию кальция в кишечнике животных и человека. Кишечная микробиота нижнего отдела кишечника может ферментировать ФОС, что приводит к образованию газов, снижению рН и, как следствие, к повышению растворимости и биодоступности кальция.

Полисахариды

Гликаны – общее название полисахаридов, состоящих из большого числа моносахаридов, соединенных О-гликозидными связями. Полисахариды представляют собой конденсационные полимеры, в которых гликозидная связь образуется между гликозильной частью гемиацетала или гемикетала и гидроксильной группой другой единицы сахара, действующей как акцепторная молекула или агликон. Полисахариды могут быть линейными или разветвленными.

Существует два типа полисахаридов: гомополисахариды и гетерополисахариды. Гомополисахариды образованы однотипными моносахаридами, повторяющимися в цепи. Молекулы гетерополисахаридов образованы не менее чем двумя типами моносахаридов. Неразветвленные полисахариды содержат только альфа-1,4-связи, тогда как некоторые разветвленные полисахариды связаны с одной молекулой альфа-1,4-, а с другой молекулой альфа-1,6-гликозидными связями. Разветвленные полисахариды представляют большой интерес с точки зрения физиологии питания.

Конъюгированные углеводы

Углеводы могут образовывать производные в виде соединений с белками, липидами и фенолами. Эти производные называют гликанами (гликопротеинами, гликолипидами и гликофенолами соответственно), и они играют главенствующую роль в физиологической активности белков, липидов и фенолов, повышая их биодоступность.

Гликозилирование и дегликозилирование белков рассматривается как возможная стратегия для корректировки иммунореактивности важнейших пищевых аллергенов или формирования необходимых функционально-технологических свойств белков.

Разработка новых аналитических подходов к разделению, идентификации и количественному анализу углеводов имеет огромное значение. Информация о содержании углеводов в плодоовощной продукции, зерновых и многих других продуктах необходима для определения таких важных свойств пищевых продуктов, как их флейвор, спелость, качество, аутентичность, а также для установления условий хранения. Кроме того, информация о составе и содержании углеводов важна для оценки роли в жизнедеятельности человеческого организма, что представляет исключительный интерес для производства полезных для здоровья пищевых продуктов.

7.2 Подготовка проб для проведения анализа

Главным и наиболее сложным этапом анализа углеводного состава пищевых матриц является отделение углеводов от других основных компонентов (липидов и белков), которые так или иначе мешают качественному и количественному анализу углеводов. После выделения фракции углеводов их подвергают дополнительной обработке (например, гидролизу и/или дериватизации) для облегчения последующих аналитических операций.

Экстракция и фракционирование

Перед количественным определением углеводы обычно отделяют от других компонентов пищевого продукта, используя некоторые виды экстракции или очистки. Тем не менее, в некоторых случаях полученная после этих операций проба остается слишком сложной для анализа и требуется ее фракционирование. Ниже мы рассмотрим методы, используемые для экстракции и фракционирования углеводов.

Фильтрация

Обычно при исследовании углеводной фракции напитков или других пищевых жидкостей (вина, молока, сыворотки) для подготовки проб к анализу достаточно фильтрации и разбавления. Для концентрирования углеводов можно использовать ультрафильтрацию или другие виды мембранного фильтрования. Тем не менее, если исходный матрикс слишком сложен или содержит разнообразные углеводы различных классов, для подготовки проб необходимы более сложные аналитические операции. Следует отметить, что фильтрация может использоваться в качестве способа предварительной очистки перед применением любой из нижеописанных процедур.

Традиционные методы экстракции. Жидко-жидкостная твердофазная экстракция

В настоящее время так называемые традиционные методы экстракции –

жидко-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) и твердофазная экстракция (ТФЭ) – широко используются для экстракции углеводов из пищевых матриц перед их последующим определением. ТФЭ применяется, в частности, для экстрагирования углеводов из вина, пива и меда.

Твердый наполнитель колонки и растворители, используемые для элюирования, выбирают в зависимости от природы анализируемого образца. Чаще всего используют картриджи с C_{18} . Применяются также картриджи с C_8 , с пористым графитом и с катионообменными смолами. ТФЭ можно с успехом использовать для фракционирования сложных пищевых смесей, например, фракционирование моносахаридов и олигосахаридов из меда, которое проводилось на колонках с активированным углем и целлитом. Для селективного элюирования используют смеси этанола и воды в различных пропорциях. Хотя результаты, полученные при использовании этих методов, были вполне удовлетворительными, некоторые недостатки, например большие объемы используемых органических растворителей, затрудняют широкое применение данных методов экстракции.

Сверхкритическая флюидная экстракция

Сверхкритическая флюидная экстракция (СКФЭ) основывается на использовании сжиженных газов при давлении и температуре, превышающих их критические значения. В этих условиях сверхкритические флюиды приобретают некоторые свойства, характерные для жидкостей (сходная растворимость) и для газов (сходная диффузность).

Наиболее распространенным флюидом в настоящее время является CO_2 . Основными его преимуществами перед другими флюидами являются умеренные значения критической температуры и давления, легкость изменения селективности экстракции путем изменения рабочего давления, возможность получения фракций на различных этапах сбрасывания давления и получения экстракта, не содержащего растворителя, поскольку при снижении давления до атмосферного CO_2 выделяется в виде газа. Тем не менее, применение СКФЭ для анализа углеводов затруднено его низкой полярностью, что затрудняет сольubilизацию углеводов. Для решения этой проблемы в качестве модификаторов используют различные количества органических растворителей. СКФЭ применяли для фракционирования различных классов углеводов, которые в дальнейшем предполагалось использовать в качестве пребиотиков в составе пищевых продуктов в промышленных масштабах. Установлено, что селективность экстрагирования в основном зависит от состава соразтворителей, тогда как на степень извлечения углеводов влияют другие параметры (температура, давление и количество полярного соразтворителя). Предполагается, что подобный подход можно использовать и в других случаях для экстракции и фракционирования углеводов.

Жидкостная экстракция под давлением

Жидкостная экстракция под давлением (*PLE*) основывается на использовании растворителей при достаточно высоких температурах и давлении, обеспечивающих сохранение растворителей в жидком агрегатном состоянии в течение всего процесса экстракции. Экстракционные процессы в таких условиях протекают быстрее, с более высоким выходом и меньшими объемами растворителей по сравнению с традиционными методами экстракции. Благодаря этим преимуществам *PLE* широко применяется для экстрагирования компонентов из переработанных и натуральных пищевых продуктов. В *PLE* можно использовать различные растворители, включая воду, органические растворители и их смеси. Что же касается фракционирования углеводов, известно о селективной экстракции лактулозы из ее смесей с лактозой, при этом использовалась смесь этанол-вода (70:30) при 40 °С в течение 30 мин. Кроме того, использование *PLE* в комбинации с активированным углем позволило получить обогащенные фракции ди- и трисахаридов из меда. В этом случае мед адсорбировали на активированный уголь, упакованный в экстракционную ячейку *PLE*. Процедура предусматривала два экстракционных цикла: в первом цикле использовали смесь этанол-вода в соотношении 1:99 в течение 5 мин, во втором – ту же смесь в соотношении 50:50 в течение 10 мин. Эту процедуру *PLE* можно легко адаптировать для фракционирования углеводов из других источников.

Фракционирование в потоке под действием силовых полей

Этот метод основывается на разделении компонентов пробы (как правило, высокомолекулярных), ламинарный поток которых нагнетается внутрь открытого канала, к которому приложено электрическое, термическое, магнитное или гравитационное поле. Разделение или фракционирование осуществляется в результате различий в подвижности компонентов под действием поля. Этот метод чаще всего используется для фракционирования высокомолекулярных полисахаридов, в частности, целлюлозы, крахмала и пуллулана, которые невозможно фракционировать иным способом.

Хроматографические методы

Для фракционирования и разделения углеводов применяют различные методы, основанные на процедуре хроматографирования.

Эксклюзионная (гель-фильтрационная или ситовая) хроматография (*SEC*) – один из наиболее популярных методов, используемых для разделения высокомолекулярных углеводов. *SEC* зачастую используют для фракционирования и разделения олиго- и полисахаридов, включая анализ пребиотических галактосахаридов и анализ углеводов в рисе, сорго, пшенице и кофе.

Другим хроматографическим методом, широко применяемым для фракционирования углеводов, является ионообменная хроматография (*IEC*), которая более всего подходит для фракционирования олиго- и моносахаридов. В

зависимости от конкретных особенностей при этом используют как анионообменные, так и катионообменные смолы. Обычно *ИЕС* используют в качестве аналитической операции.

Последним среди этой группы методов является метод хроматографии в псевдооживленном слое. Этот метод широко используют в сахарной промышленности для крупномасштабного фракционирования смеси палатинозы (изомальтозы) и трегалозы. Два потока продуктов (рафинат и экстракт) получают путем непрерывного противоточного разделения пробы, элюируемой из нескольких различных адсорбентов. Этот метод использовался также для фракционирования лактозы из сложной смеси олигосахаридов грудного молока.

Химическая обработка

На этапе подготовки проб пищевых углеводов обычно используют две химические процедуры (гидролиз и дериватизация), которые облегчают проведение последующего анализа.

Гидролиз

Чаще всего перед хроматографическим анализом высокомолекулярные углеводы подвергаются гидролизу для получения фракций моно- или олигосахаридов. Нагревание в присутствии сильных кислот, из которых обычно используется трифторуксусная, соляная или серная кислоты, приводит к разрушению гликозидных связей. Для достижения полного гидролиза полисахаридов, содержащихся в образце, условия обработки, и в первую очередь концентрация кислоты, температура и продолжительность гидролиза должны быть оптимизированы. В то же время эти условия не должны быть слишком жесткими во избежание деградации образца, так как известно, что моносахариды, высвобождаемые в процессе этой процедуры, предрасположены к деградации. Например, типичные условия обработки пшеничной муки включают использование 2 М HCl при 100 °С в течение 90 мин. Полисахариды также могут подвергаться частичному гидролизу перед последующим анализом. Учитывая дифференциальную чувствительность к гидролизу различных гликозидных связей, частичная деградация, производимая в контролируемых условиях, позволяет получать смеси различных моно- и олигосахаридов, анализ которых может быть полезен при определении структуры полисахаридов. Имеется опыт использования микроволнового излучения для сокращения продолжительности процесса гидролиза углеводов.

Дериватизация

Дериватизация – один из методов анализа, используемый в химии, который превращает анализируемое химическое соединение в продукт с похожей химической структурой, называемый дериватом (производным). Принимая во внимание присущие углеводам свойства, их трудно анализировать из-за слабой летучести этих веществ, отсутствия хромофора или очень сходной полярности. Поэтому при использовании газовой хроматографии для повышения летучести

требуется дериватизация углеводов. Моносахариды можно анализировать методами ГХ в виде алдитолацетатов, полученных путем восстановления и ацетилирования моносахаридов. Олигосахариды можно определять методами ГХ в форме трифторацетиловых или триметилсилиловых эфиров.

Если в качестве методов анализа углеводов выбраны капиллярный электрофорез (КЭ) или высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), то особое внимание необходимо уделить требуемой чувствительности метода, поскольку подавляющее большинство интактных углеводов способно поглощать ультрафиолетовый свет только при длине волны меньше 195 нм. Кроме того, их можно детектировать с помощью амперометрических или рефрактометрических детекторов. Поэтому для увеличения чувствительности детектирования углеводов в различных процессах дериватизации используют УФ-абсорбирующие или флуоресцентные метки. Эта реакция считается самой распространенной процедурой предколоночной дериватизации и может быть использована перед началом анализа или в его процессе. Наиболее часто используемый подход предполагает процесс восстановительного аминирования. Эта процедура основана на конденсации карбонильной группы с первичными аминами для получения оснований Шиффа, которые при восстановлении дают N-замещенный гликозиламин. В качестве реагента чаще всего используют 2-аминопиридин трисульфат. Кроме того, учитывая нейтральность и гидрофильность большинства углеводов, дериватизация не только повышает чувствительность, но и вызывает изменения полярности и электрического заряда, облегчающие их разделение методами КЭ или ВЭЖХ.

7.3 Методы определения углеводов

Количественное определение углеводов проводят различными методами, выбор которых зависит от реакционной способности различных групп углеводов. Углеводы условно делят на простые сахара, усвояемые и неусвояемые полисахариды.

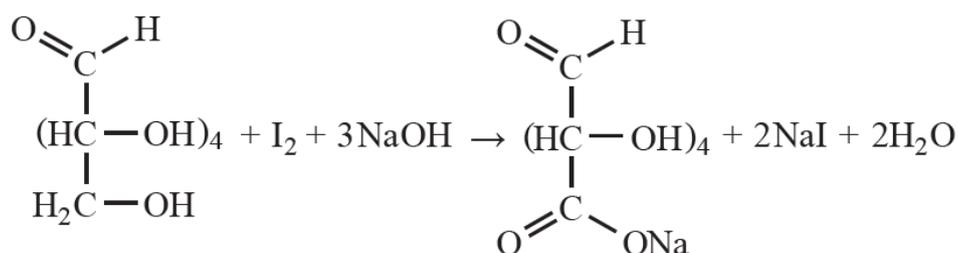
Химические методы количественного определения углеводов в продуктах питания основываются на редуцирующей способности сахаров. Если анализируемые углеводы являются нередуцирующими, то их предварительно подвергают гидролизу, в ходе которого в зависимости от состава искомого сахара будет образовываться смесь редуцирующих. Дальнейший анализ проводят по тем же методам, что и при анализе редуцирующих сахаров: титриметрическим или спектрофотометрическим методами.

Простые сахара

Простые углеводы извлекают из объектов исследования 80 % этанолом при нагревании до 75-80 °С. Сильнокислые продукты, такие как фрукты, овощи, продукты их переработки и т.п., для предотвращения процессов гидролиза

полисахаридов спирт предварительно нейтрализуют слабощелочными солями. После экстракции спирт удаляют отгонкой при пониженном давлении и температуре не более 40 °С, а анализируемую массу разбавляют горячей водой и отфильтровывают. Для образцов с высоким содержанием белков и фенольных соединений фильтрат дополнительно обрабатывают раствором ацетата свинца $Pb(CH_3COO)_4$, а его избыток нейтрализуют раствором фосфата натрия, оксалата натрия или сульфата натрия. После обработки выпавший осадок отфильтровывают через бумажный фильтр, полученный фильтрат используют для определения содержания редуцирующих сахаров одним из нижеописанных методов.

Йодометрический метод представляет собой титриметрический метод, при котором йода в щелочной среде окисляет альдосахара в соответствующие уроновые кислоты. Общее уравнение реакции можно представить в следующем виде:



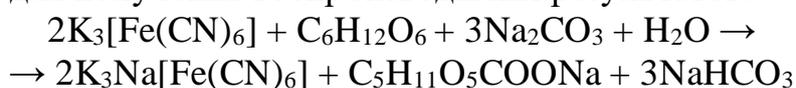
По окончании реакции щелочь нейтрализуют раствором кислоты, а избыток йода оттитровывают раствором тиосульфата натрия

Вычисление содержания альдосахаров (X) в объекте вычисляют по формуле 7.1

$$m_X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot N_{Na_2S_2O_3} \cdot M_{\text{экв}(X)}}{1000} \cdot \frac{V_0}{V_{\text{ал}}}, \quad (7.1)$$

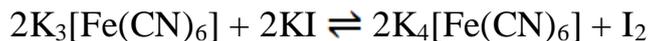
где V_1 и V_2 – объемы раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование холостого и исследуемого раствора соответственно, см^3 ; $N_{Na_2S_2O_3}$ – нормальная концентрация раствора тиосульфата натрия, н; $M_{\text{экв}(X)}$ – эквивалентная молярная масса определяемого углевода; $V_0/V_{\text{ал}}$ – коэффициент, учитывающий разбавление.

Феррицианидный метод – метод, основанный на реакции окисления простых сахаров гексацианоферратом (III) калия в слабощелочной среде. Для количественного определения сахаров важно соблюдать идентичные параметры ведения анализа для получения воспроизводимых результатов.



Глюкоза по действием гексацианоферрата (III) калия будет окисляться до глюконовой кислоты, а гексацианоферратом (III) калия – восстанавливаться до

гексацианоферрата (II). Избыток гексацианоферрата (III) калия оттитровывают раствором йодида калия в кислой среде:

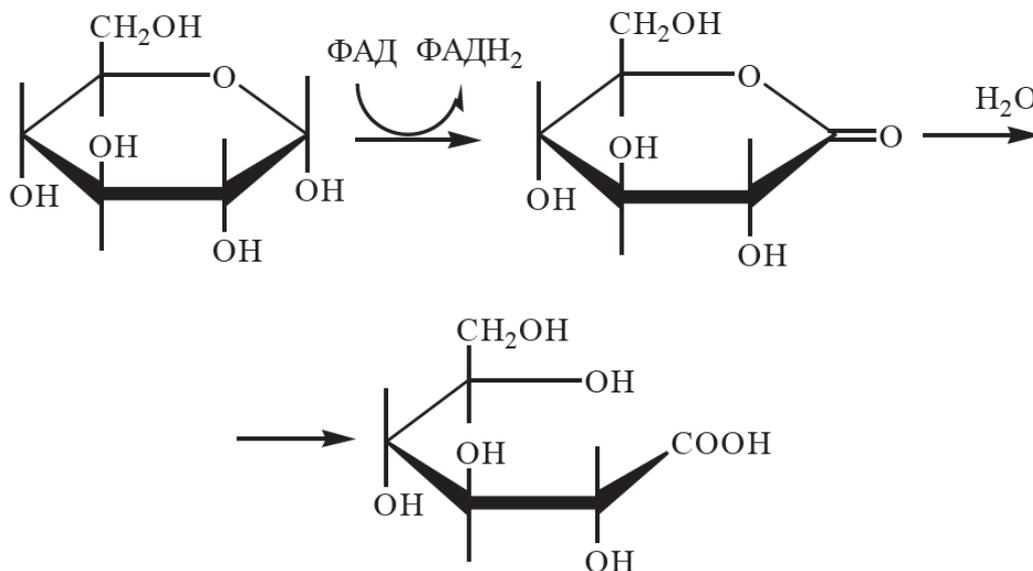


Эта реакция обратима, поэтому гексацианоферрат (II) калия под действием сульфата цинка переводят в нерастворимую форму в виде $\text{K}_2\text{Zn}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$.

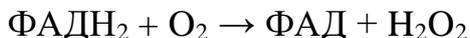
Как и в йодометрическом методе избыток свободного йода должен быть оттитрован раствором тиосульфата натрия, а содержание альдсахаров определяют по формуле 7.1.

Глюкозооксидазный метод является спектрофотометрическим методом. Он базируется на способности фермента глюкозооксидазы окислять β -D-глюкозу до глюконовой кислоты. Ферментный препарат глюкозооксидаза представляет собой флавопротеин, обладающий высокой специфичностью по отношению к β -D-глюкозе.

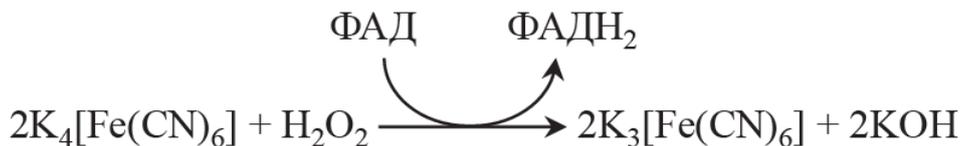
Глюконовая кислота из глюкозы будет образоваться поэтапно: сначала образуется лактон глюконовой кислоты, а также восстанавливается простетическая группа флавинадениндинуклеотида (ФАД). Далее лактон самопроизвольно гидролизуется до глюконовой кислоты, как представлено на схеме:



ФАДН₂ (восстановленная форма флавинадениндинуклеотида) переносит протоны на кислород, вследствие чего образуется перекись водорода в равном окисленной глюкозе количестве:



Пероксидаза, которая содержится в ферментном препарате, способствует окислению пероксидом водорода гексацианоферрата (II) до гексацианоферрата (III), окрашенной в ярко-красный цвет («красная кровяная соль»):



По интенсивности окраски раствора определяют содержание глюкозы в исходном растворе при длине волны 510 нм. Устойчивость окраски сохраняется в течение 1 часа.

Содержание глюкозы (m, г) определяют методом стандартов и рассчитывают по формуле 7.2

$$m = \frac{c_{\text{ст}} \cdot A_{\text{X}} \cdot V}{A_{\text{ст}}} \quad (7.2)$$

где A_{X} и $A_{\text{ст}}$ – оптические плотности исследуемой пробы и стандарта соответственно; $c_{\text{ст}}$ – содержание глюкозы в калибровочной пробе, мг/см³; V – объем анализируемого гидролизата, см³; $V_0/V_{\text{ал}}$ – коэффициент, учитывающий разбавление гидролизата.

Метод Бертрана (перманганатный метод). Основопологающей реакцией данного метода является окисление сахаров под действием растворов комплексных соединений меди. Данный комплекс образуется при смешении раствора серно-кислой меди (Фелинг №1) и щелочного раствора сегнетовой соли (Фелинг №2) в соотношении 1:1. Нагревание смеси Фелинга приводит к окислению редуцирующих сахаров с превращением окиси меди (CuO) в закись меди (Cu₂O). Оксид меди (I) растворяют кислым раствором железоаммонийных квасцов или серно-кислого окисного железа, при этом происходит восстановление сульфата железа (III) до сульфата железа (II), которое оттитровывают раствором перманганата натрия или калия. По количеству перманганата натрия или калия рассчитывают количество восстановленной меди и, как следствие, определяют количество сахара, используя специальные таблицы.

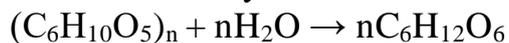
Усвояемые полисахариды

К усвояемым полисахаридам относят в первую очередь крахмал (C₆H₁₀O₅)_n, который является основным компонентом картофеля, зерна и многих других видов пищевого сырья, так как он выполняет функции резервного полисахарида. Крахмал представляет собой смесь двух типов полимеров: амилозы и амилопектина. Амилоза имеет линейное строение, состоит из остатков глюкопиранозы, связанных 1-4 связью, и имеет спиралевидное строение. Амилопектин представляет собой полимер, состоящий из остатков α-D-глюкопиранозы с разветвленной структурой, образованной связями 1-4, 1-6, 1-3. Амилоза вступает в реакцию с йодом, давая синее окрашивание, а амилопектин – красно-фиолетовое окрашивание.

Одного стандартного метода определения крахмала в пищевом сырье и продуктов не существует. Общим для этих методов является предварительная очистка образцов от простых сахаров экстрагированием 80 %-ным этанолом. Крахмал из продуктов извлекают сначала растворением в холодной, а затем в горячей воде или в растворе соли, или в растворе щелочи, или в растворе хлорной кислоты. Осветление растворов и очистку образцов проводят белковыми осадителями, такими как ацетат цинка, фосфорно-вольфрамовая кислота, уранилацетат, желтая кровяная соль и др.

Гравиметрически крахмал определяют его предварительным осаждением 90 %-ным этиловым спиртом и дальнейшей промыванием 70 %-ным этанолом.

Крахмал не является восстанавливающим сахаром, поэтому его предварительно необходимо гидролизовать либо кислотами, либо ферментом амилазы с расщеплением до α -D-глюкозу:



Кислотный гидролиз крахмала приводит к образованию глюкозы, при ферментативном расщеплении процесс протекает с образованием дисахарида мальтозы, который под действием α -глюкозидазы (мальтазы) гидролитически распадается до двух молекул глюкозы.

Ферментативный гидролиз более трудоемок, однако это позволяет определять крахмал в присутствии других полисахаридов.

Так как конечным продуктом кислотного и ферментативного гидролиза является глюкоза, то все методы химического количественного крахмала основаны на использовании различных их свойств (редуцирующей способности, оптической активности и др.).

Наиболее популярными являются поляриметрические методы определения крахмала.

Для некоторых продуктов (например, в хлебе) необходимо определять декстрины, которые являются промежуточными продуктами гидролиза крахмала. Декстрины экстрагируются теплой водой, а затем осаждаются 96 %-ным этанолом. Выделившийся осадок гидролизуют 2 %-ным раствором хлороводородной кислоты на водяной бане и определяют редуцирующие сахара.

Однако, поскольку с точки зрения пищевых свойств они усваиваются так же, как и крахмал, то иногда отдельного определения их не производят, и декстрины определяют вместе с крахмалом.

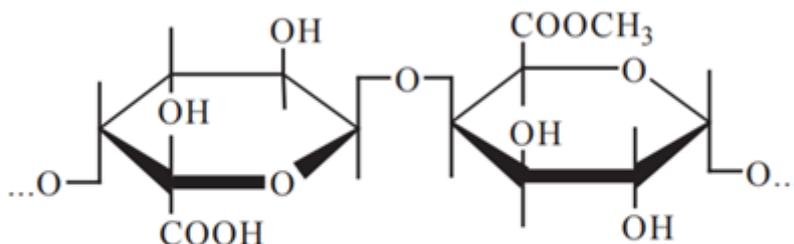
Неусвояемые углеводы

Наибольший интерес среди неусвояемых углеводов вызывает пектин, гемицеллюлоза и клетчатка.

Пектин (пектиновые вещества) входит в состав клеточной стенки и межклеточного пространства растительного сырья. Растительные клетки

содержат две основные формы пектиновых веществ: гидропектин (пектин растворимый) и протопектин (пектин нерастворимый).

Основу молекулы гидропектина составляют остатки D-галактуроновой кислоты, связанных между собой α (1–4)-гликозидными связями, которые частично метоксилированы по шестому углеродному атому и нейтрализованы ионами кальция. Степень этерификации пектинов достигает 35-90 %.



Гидропектин

Протопектин – группа соединений, которую объединяет их нерастворимость в воде и способность при гидролизе образовывать пектиновые кислоты. Протопектин образован из последовательных пектиновых цепей за счет соединения ионов многовалентных металлов с неэтарифицированными карбоксильными группами с помощью эфирных мостиков с фосфорной кислотой.

Наивысшее содержание пектина обнаруживается в плодах и корнеплодах. Содержание растворимого пектина обычно превалирует, хотя в некоторых овощах и фруктах чаще в сыром состоянии можно обнаружить значительные количества труднорастворимого протопектина.

Как и для крахмала, стандартного метода определения пектина не существует. Основная проблема заключается в том, что результаты для различных методов могут значительно отличаться. Наибольшую сходимость результатов получают при проведении методики, включающей следующие этапы.

Простые сахара предварительно экстрагируют 80 %-ным этиловым спиртом трехкратной экстракцией. Растворимые пектины выделяют, растворяя их в воде при 45 °С в течение 30 мин, либо горячей водой, либо раствором оксалата аммония, либо раствором трилона Б. Для извлечения протопектина оставшийся осадок дополнительно кипятят с раствором соляной кислоты, после чего продолжают кипячение цитрата натрия. При этом протопектин гидролизует до растворимого пектина.

Одним из методов определения пектинов в анализируемых продуктах является гравиметрический метод, при котором взвешивают высушенный осадок, предварительно осажденный хлоридом кальция. По массе полученного пектата кальция определяют содержание пектина, используя гравиметрический фактор – 0,9235.

Другим методом определения является комплексометрический метод, при котором определяют содержание кальция в осадке и по нему вычисляют содержание пектинов.

Гемицеллюлозы объединяют в себя группу высокомолекулярных полисахаридов, образующих клеточные стенки растительных тканей. В их состав входят различные пентозаны, которые образуют при гидролизе пентозы (арабинозу, ксилозу), гексозаны, гидролизующиеся до гексоз (манноза, галактоза, глюкоза, фруктоза) и группа смешанных полисахаридов, гидролизующихся до пентоз, гексоз и уроновых кислот [12]. Строение гемицеллюлозы чаще всего разветвленное; расположение моноз внутри полимерной цепи сильно различается. Связь их друг с другом осуществляется с участием полуацетального гидроксильного и гидроксильных групп у 2, 3, 4, 6-го углеродных атомов [12].

Структурные единицы гемицеллюлозы близки к пектинам: они также содержат в своем составе пентозы и галактуроновую кислоту. Однако при этом они значительно труднее гидролизуются.

Основополагающим процессом при количественном анализе гемицеллюлоз являются редуцирующие свойства мономерных остатков, образующихся при гидролизе. Предварительно удаляются сахара экстракцией 80 %-ным этанолом и пектины растворением в теплой воде. Выделение гемицеллюлоз из аналитической пробы проводят раствором хлороводородной кислоты или гидроксида натрия и дальнейшей нейтрализацией образовавшегося гидролизата.

Под понятием клетчатка (пищевая или сырая) подразумевают целлюлозу с небольшим содержанием лигнина и гемицеллюлоз. Молекула целлюлозы состоит из остатков β -D-глюкопиранозы, связанной 1-4, имеет линейное строение. Целлюлоза абсолютно не растворима в воде, при обычных условиях кислотами не гидролизуеться.

Определение суммарного количества целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина проводят по методу Геннесберга и Штомана, также называемому методом «сырой» клетчатки. Выделение «сырой» клетчатки проводят последовательной обработкой анализируемого образца кислотой, щелочью и спиртоэфирной смесью.

Смесь уксусной и азотной кислоты или серной кислоты позволяет удалить из пробы легкорастворимые углеводы, такие как простые и сложные сахара. Также при этом гидролизуются азотистые соединения. Добавление небольших количеств хлорной кислоты позволяет ускорить процесс гидролиза. Гидроксид натрия омыляет жиры, а также растворяет белки. Смесью спиртов и эфиров извлекают жиры из образца.

Остаток выделяют фильтрованием через предварительно взвешенный фильтр, промывают, сушат и определяют содержание «сырой» клетчатки гравиметрическим методом.

7.4 Современные методы анализа углеводов в пищевых продуктах

Основные аналитические средства, используемые для анализа углеводов и пищевых продуктов – это спектроскопические методы, методы разделения и их многочисленные комбинации.

Спектроскопические методы

В течение многих лет для качественного и количественного анализа пищевых продуктов и ингредиентов использовались различные спектральные методы: в видимой, инфракрасной и ультрафиолетовой области спектра, флуоресцентные, рамановские, атомно-абсорбционные, атомно-эмиссионные, электронного спинового резонанса, ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и масс-спектрометрические (МС).

В наши дни наблюдается отчетливая тенденция к преимущественному использованию методов ЯМР и МС высокого разрешения, которые предусматривают детектирование и идентификацию соединений (метаболитов) углеводов, аминокислот, витаминов, гормонов, флавоноидов, фенолов и глюкозинолатов, а также определение их роли в питательных и органолептических свойствах пищевых продуктов, включая другие важные темы, такие как рост растений и животных, развитие, адаптация или защита растений от стресса. Методы ЯМР и МС обладают впечатляющими возможностями для анализа пищевых углеводов и используются в настоящее время для идентификации и характеристики компонентов пищевых продуктов

Ядерный магнитный резонанс

Поскольку структура молекул углеводов определяет их функцию, использование ЯМР приобретает ключевое значение, так как этот метод может предоставить информацию о структуре, чистоте и безопасности углеводных образцов. ЯМР широко используют для идентификации пищевых углеводов и родственных соединений, включая недавно созданные и природные углеводы. В настоящее время нативные олигосахариды пищевых матриц и недавно синтезированные полисахариды представляют большой интерес из-за многочисленных областей их применения в пищевой промышленности (подсластители, полезные для здоровья добавки и т. д.).

В наши дни возрастает интерес к поиску природных дешевых биоактивных соединений, которые можно использовать в качестве полезных для здоровья пищевых ингредиентов и функциональных пищевых продуктов. Наиболее популярные во всем мире олигосахарады – это ФОС, однако практически отсутствует информация о свойствах других фруктанов неинулинового типа. Применение ^1H ЯМР вместе с ферментным гидролизом позволило идентифицировать фруктаны во фракциях помола двух сортов пшеницы. Арабиноксилан – один из важных неусвояемых компонентов пищевой клетчатки.

ЯМР также успешно использовали при структурном исследовании трисахаридов, полученных ферментативной трансгликозилированием лактулозы.

Известно использование одномерного (^1H и ^{13}C *TOCSY*) или двухмерного (*gCOSY*, *TOCSY*, *ROESY*, *gHSQC* и *gHMBC*) метода ЯМР. Установлена структура двух трисахаридов, полученных ферментативной обработкой лактулозы. Основываясь на данных, полученных в результате ЯМР-анализа трисахаридов, в качестве нового способа синтеза пребиотиков был предложен метод ферментативного трансгликозилирования.

Имеется опыт использования ЯМР для анализа сложных углеводсодержащих органических соединений, таких как меланоидины кофе. Эти меланоидины участвуют в формировании цвета и флейвора кофе и, как полагают, обладают физиологической активностью. Применение двухмерного метода ЯМР позволило получить новую информацию, которая подтверждает, что меланоидины кофе представляют собой конденсированные полифенолы. Эти данные противоречат информации, опубликованной ранее, согласно которой меланоидины кофе образуются из низкомолекулярных хромофоров, связанных с полисахаридами или белками. Считается, что спектрометрический подход, особенно ЯМР, очень важен для анализа углеводов, связанных с белками и другими физиологически значимыми нутриентами пищевых продуктов.

С помощью ^1H и ^{13}C ЯМР были идентифицированы и другие сложные углеводы, том числе полисахариды. Например, ЯМР использовался для определения основных полисахаридов клеточных стенок лесного ореха. С помощью метода ЯМР был описан состав полисахаридов в незрелых томатах и лекарственных грибах.

Масс-спектрометрия

МС – мощный аналитический метод, используемый для идентификации химических соединений по отношениям массы к заряду (m/z).

Перед подачей на МС-анализатор вещество необходимо подвергнуть ионизации. Чаще всего используемые методы ионизации для анализа органических соединений, в том числе пищевых углеводов, – это электронная ионизация, химическая и ионизация, электроспрей-ионизация (*ESP*), плазменная десорбционная ионизация и матричная лазерная десорбционная ионизация (*MALDI*).

Структурный анализ углеводов всегда был трудной задачей, учитывая их многочисленные производные, сложную природу и низкую летучесть. В настоящее время МС считают исключительно важным методом для проведения экспресс-анализов структуры и функций макромолекул в рамках так называемой гликомики – науки об углеводах.

При использовании МС-анализа решающее значение для получения достоверных данных о структуре вещества имеет выбор правильного матрикса и метода ионизации. Например, *TOE*-МС в сочетании с *MALDI* считается более чувствительным методом при детектировании крупных молекул олигосахаридов, тогда как *ESI*-МС может быть более полезен для исследований их структуры.

Методы МС использовались для анализа выделенных углеводов, имеющих большое значение в пищевой химии. Времяпролетная МС в сочетании с *MALDI* применялась для исследования олигосахаридов в образцах овощей (топинамбур, красный лук и глюкозный сироп из картофеля); после оптимизации спектрометрических условий определена степень полимеризации олигосахаридов в каждом из перечисленных пищевых объектов. Обнаружено, что *MALDI-TOF-МС* более чувствительна при детектировании олигосахаридов, чем хроматографические методы, используемые с той же целью, что подчеркивает особую роль МС для исследований пищевых углеводов.

Принимая во внимание роль методов ЯМР и МС в развитии гликомики и пищевой химии, можно ожидать широкого распространения этих методов для анализа пищевых углеводов.

Газовая хроматография

ГХ широко используется для определения углеводов в пищевых продуктах. Учитывая широкое разнообразие углеводов с точки зрения структуры, размера молекул, функциональных свойств, а также их низкую летучесть, ГХ в основном использовали при исследовании моно-, ди- и трисахаридов. Тем не менее, олигосахариды со степенью полимеризации до 7 успешно определялись ГХ с программированием температуры, достигавшей 360 °С. Наиболее используемые дериваты для газохроматического анализа углеводов – это триметилсилиловые эфиры и оксимы. Тем не менее, ацилируемые производные считаются предпочтительными для детектирования близко родственных форм, например, альдогексоз (манноза, галактоза, глюкоза) и сахарных спиртов (маннит, галактит, сорбит), которые отличаются только одной или несколькими гидрофильными группами.

При разделении сахаров с помощью ГХ обычно используют диметилполисилоксановые неподвижные фазы с заданным процентом полярных фенильных групп и программированием конечных температур, достигающих 300-320 °С. Из методов детектирования чаще всего применяется пламенно-ионизационный детектор (ПИД), хотя также используется и МС, имеющая несколько преимуществ по сравнению с традиционным ПИД. Среди этих преимуществ наиболее важны более достоверная идентификация углеводов благодаря определению молекулярной массы и структуры фрагментации, которые также могут использоваться для характеристики неизвестных углеводов. Типичный подход включает идентификацию углеводов методом ГХ-МС и количественное определение с помощью ГХ-ПИД. Этот подход применялся для идентификации и количественного определения минорных углеводов в моркови и кофе. Действительно, использование МС-детектора позволило впервые идентифицировать триметилсилилоксимы сциллоинозитола и седогептулозы в химическом составе моркови наряду с двумя другими известными минорными углеводами, маннитом и миоинозитом.

Мед – богатый углеводами продукт, состав которого зависит от его растительного источника. Для оценки состава конкретного моноцветочного меда и его источника использовали исследование состава углеводов в меде, а также их соотношения. Для правильной классификации образцов использовали статистический метод главных компонент.

Для идентификации неизвестных углеводов с успехом применялись методы ГХ-МС. Состав дисахаридов в нескольких образцах меда определяли на различных аналитических колонках. Использование двух разных колонок позволило изучить режим элюирования неизвестного дисахарида, который затем сопоставлялся с другими коммерческими стандартами. Эта информация и данные, полученные с помощью МС-анализа, подтвердили присутствие инулобиозы в образцах меда.

Другим интересным примером является определение лактулозы. Этот дисахарид образуется в результате изомеризации лактозы во время тепловой обработки молока. Показано, что концентрация лактулозы зависит от типа и интенсивности тепловой обработки, поэтому это соединение можно считать своего рода маркером процессов тепловой обработки молока, подвергнутого стерилизации или ультравысокотемпературной (УВТ) обработке. Для определения лактулозы предложены различные методы, в том числе газохроматографический анализ с разделением соответствующих триметилсилиловых эфиров на капиллярной колонке со смесью дифинилдиметилсилоксан (50:50). Эта процедура позволила определить лактулозы в термообработанном молоке (УВТ, стерилизованном, пастеризованном, концентрированном и сухом молоке). Было показано, что количество лактулозы, определенное в УВТ-молоке, было значительно выше, чем в пастеризованных образцах – следовательно, это соединение может служить маркером тепловой обработки в товарных образцах. Подобным образом определение углеводов может использоваться даже для выявления фальсификации пищевых продуктов.

В качестве возможного маркера интенсивности тепловой обработки рассматривался другой дисахарид – мальтулоза, образующаяся в результате изомеризации мальтозы в ходе тепловой обработки. Как возможный индикатор для оценки теплового воздействия во время производства и хранения детских смесей предложено использовать отношение мальтоза/мальтулоза, полученное путем газохроматографического анализа. Дифруктозные ангидриды также использовали как маркеры качества в пищевых продуктах с высоким содержанием сахара, например, в меде и кофе. Эти соединения образуются в результате конденсации двух молекул фруктозы в ходе реакций карамелизации, которые протекают при нагревании. Их анализировали методом ГХ, чтобы затем статистически дифференцировать образцы, подвергнутые различным способам тепловой обработки.

Также можно отметить, что, хотя ГХ дает превосходные результаты при

анализе пищевых углеводов, это метод пригоден для относительно небольших молекул углеводов, а его практическое использование ограничено обязательным этапом пробоподготовки. Для преодоления этих ограничений разработаны методы, основанные на КЭ и ВЭЖХ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ – в настоящее время основной аналитический метод, используемый для анализа углеводов. Несмотря на то, что чувствительность ГХ-метода выше, ВЭЖХ-анализ быстрее, не требует дериватизации образцов, позволяет анализировать высокомолекулярные углеводы и использовать различные механизмы разделения и детектирования.

Механизмы разделения

Механизм разделения сложных углеводных смесей выбирают в зависимости от анализируемого матрикса, целевых углеводов и доступности оборудования. Среди наиболее популярных для анализа углеводов методов ВЭЖХ – *IEC*, *SEC* и разделительная (нормально- или обращенно-фазовая) хроматография.

Ионообменная хроматография углеводов может выполняться с использованием анионо- или катионообменных смол. Особенно успешной для анализа углеводов оказалась высокоэффективная анионообменная хроматография (ВЭАОХ). Чтобы осуществить разделение, для ионизации углеводов при сильнощелочных условиях обычно используют смолы, содержащие четвертичный аммоний, хотя в наши дни доступны различные типы коммерческих колонок. К выбору подвижной фазы следует подходить особенно тщательно, поскольку от этого зависит не только селективность разделения, но и общее время анализа. Кроме моно- и дисахаридов ВЭЖХ может использоваться для анализа олигосахаридов. Разработаны различные методы для разделения олигосахаридов по степени их полимеризации. Например, при изучении олигосахаридов из образцов меда и кукурузной патоки использовался градиент от 1 М ацетата натрия до деминерализованной воды при постоянном присутствии в растворах 1 М гидроксида натрия в течение всего анализа. С помощью этого метода были разделены различные мальто-олигосахариды (степень полимеризации от 1 до 16).

Для разделения моно- и олигосахаридов в различных пищевых матриксах используют также катионы металлов (Ca^{2+} или Ag^+). Механизм удерживания катионов в этом случае основан на образовании комплексов между ионами металла и гидроксильными группами углеводов. Данный метод разделения, называемый также лигандообменной хроматографией, обеспечивает полное разделение энантиомеров моносахаридов (глюкозы, маннозы или галактозы), а также разделение сахарных спиртов. Тем не менее, у этого метода имеется несколько недостатков: колонки не очень надежны, поскольку при анализе сложных образцов ионы металлов могут элюироваться из смол, а разделение олигосахаридов зачастую является недостаточным из-за очень слабого

взаимодействия с ионами металлов.

Другим методом, широко используемым для разделения пищевых углеводов, является эксклюзионная хроматография (*SEC*). *SEC* также может использоваться для фракционирования углеводов. Кроме того, уже существуют аналитические колонки, которые позволяют использовать *SEC* как метод на основе ВЭЖХ. Этот механизм разделения использует просачивание веществ через смолы с определенными размером пор и структурой. Полисахариды, будучи полимерными молекулами, не проникают в трехмерную сеть внутри смолы и, следовательно, элюируются первыми. Остальная часть компонентов элюируется в порядке уменьшения размера молекул. Таким образом, взаимодействие моносахаридов небольшого размера со смолами выражено сильнее, и для их элюирования требуется больше времени.

Контрольные вопросы

1. Дайте классификацию углеводам по структурным признакам.
2. Дайте определение «конъюгированным углеводам».
3. Каким образом проводят подготовку проб для проведения анализа на количественное определение содержания углеводов?
4. Дайте определение понятию «дериватизация».
5. Опишите основные методы количественного определения простых углеводов в пищевом сырье и готовых продуктах.
6. Каким образом проводят пробоподготовку к определению крахмала в пищевых продуктах?
7. Опишите методы определения неусвояемых полисахаридов.
8. Какие современные методы используются для количественного определения углеводов в пищевых продуктах?

8 МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

8.1 Биологическая ценность минеральных веществ

В земной коре содержится около 90 химических элементов. Около двадцати пяти из них относятся к эссенциальным веществам, поэтому они присутствуют в живых клетках. Их источниками являются пищевые продукты животного и растительного происхождения. Пищевые продукты содержат и другие элементы, поскольку живые системы могут аккумулировать их из окружающей среды вместе с эссенциальными. Кроме того, различные элементы могут попадать в пищу в процессе уборки урожая, приготовления и хранения продуктов, а также содержаться в биологически активных добавках к пище [10].

Хотя общепринятого понятия «минеральный» применительно к пище и питанию нет, обычно этот термин объединяет все элементы, присутствующие в пище, кроме углерода, водорода, кислорода и азота. Указанные четыре «неминеральных» элемента входят преимущественно в состав органических молекул и воды и составляют около 90 % от общего числа атомов, составляющих живые системы. Таким образом, минеральные элементы содержатся в пище в относительно мелких концентрациях, но несмотря на это они играют ключевую роль как в живых системах, так и в пищевых продуктах.

Исторически сложившаяся классификация разделяет все минеральные соединения в зависимости от их классификации в клетках растений и животных на основные (макро-) и следовые (микро-). Эта классификация сложилась тогда, когда аналитические методы не давали возможности точно определить малые количества элементов. Поэтому термин «следовые количества» использовался для обозначения присутствия элемента в концентрациях, точное значение которых определить было невозможно. Современные аналитические методы позволяют определить точное содержание практически всех элементов периодической системы. Тем не менее, термины «основные» и «следовые» («минорные») элементы продолжают использоваться при описании роли неорганических веществ в биологических системах. К основным макроэлементам относят кальций, фосфор, магний, натрий, калий и хлор, а к микроэлементам – железо, йод, цинк, селен, хром, медь, фтор и олово.

Среднее содержание минеральных веществ в пищевых продуктах составляет около 1 %. Технологическая обработка пищевого сырья приводит к значительным потерям минеральных веществ. Основные потери при переработке растительного сырья происходят при производстве круп и муки. Очистка овощей и фруктов приводит к потере до 10-30 % минеральных соединений. В процессе кулинарной обработки в зависимости от технологии теряется 5-30 %.

Анализ минерального состава пищевых продуктов обычно осуществляют в целях выявления возможных рисков, установления пищевой ценности и

гарантированного соответствия нормативным документам по качеству и безопасности пищевых продуктов, а также для определения их подлинности или географического происхождения. Содержание одних и тех же элементов в различных пищевых продуктах значительно варьирует, но для конкретного вида пищевых продуктов является более или менее постоянным. Превышение предельно допустимых уровней содержания минеральных веществ связано с риском пищевых отравлений. Многие элементы, содержание которых в пищевых продуктах регламентируется и подлежит контролю, не относятся к нутриентам. Определяемые диапазоны содержания минеральных веществ в пищевых продуктах приведены в табл. 8.1. Их определяют для конкретного вида пищевого продукта или для группы пищевых продуктов и используют для оценки безопасности потребления данного элемента в составе пищи.

Для оценки безопасности потребления того или иного вида продуктов для различных групп населения государственные организации выполняют специальные исследования. Изучение общих пищевых рационов предполагает анализ большого количества пищевых продуктов, отобранных на основе сложившейся структуры их потребления населением.

Другой метод изучения потребления элементов с пищей – это исследования дубликатов пищевых рационов, проводимые в течение относительно короткого периода времени. Их суть заключается в том, что группа потребителей предоставляет образцы (дубликаты) употребляемых порций пищи (пищевых продуктов), которые подвергают анализу для установления содержания целевых элементов. Целью таких исследований обычно является оценка специфических аспектов потребления пищи. Проводятся также ограниченные исследования определенных видов и категорий пищевых продуктов, например, детского питания и снеков из розничной торговли. Значимость результатов исследований при использовании вышеперечисленных методов определяется правильностью планирования эксперимента, сбора информации, подготовкой лабораторных образцов, анализом содержания отдельных элементов и оценкой полученных данных. Элементы, которые чаще всего определяют в пищевых продуктах, а также цели мониторинга и определяемые диапазоны содержания элементов приведены в табл. 8.2.

Многие из этих элементов относятся к категории «металлов», однако термины «металлы» и «тяжелые металлы» неоднозначны. Во многих странах проводятся постоянный мониторинг содержания микроэлементов в пищевых продуктах, при этом для некоторых элементов имеются сводные данные об их содержании. Методы, традиционно используемые при количественном анализе элементов в пищевых продуктах, перечислены в табл. 8.3.

Таблица 8.1

Диапазоны содержания минеральных веществ в пищевых продуктах

Количества	Массовая доля, %	Содержание
Макро-	0,1-100	1-1000 г/кг
Микро-	0,001-0,1	10-1000 мг/кг
Следовые количества	0,000001-0,001	0,01-10 мг/кг
Ультраследовые количества	Менее 0,000001	Менее 10 мкг/кг

Таблица 8.2

Элементы, содержание которых в пищевых продуктах регламентировано

Элемент	Основная цель определения	Количества
Алюминий (Al)	Токсичность	Следовые
Мышьяк (As)	Токсичность	Следовые/ультраследовые
Бор (B)	Пищевая ценность	Следовые
Кадмий (Cd)	Токсичность	Следовые/ультраследовые
Кальций (Ca)	Пищевая ценность	Макро- и микроколичества
Хром (Cr)	Пищевая ценность/токсичность	Следовые/ультраследовые
Медь (Cu)	Пищевая ценность	Микроколичества/ следы
Фтор(F)	Пищевая ценность/токсичность	Следовые
Йод(I)	Пищевая ценность/токсичность	Следовые
Железо (Fe)	Пищевая ценность	Микроколичества/следы
Свинец (Pb)	Токсичность	Следовые/ультраследовые
Магний (Mg)	Пищевая ценность	Микроколичества/следы
Марганец (Mn)	Пищевая ценность	Микроколичества/следы
Ртуть (Hg)	Токсичность	Следовые/ультраследовые
Молибден (Mo)	Пищевая ценность	Следовые/ультраследовые
Никель (Ni)	Токсичность	Следовые/ультраследовые
Фосфор (P)	Пищевая ценность	Макро- и микроколичества
Калий (K)	Пищевая ценность	Макро- и микроколичества

Селен (Se)	Пищевая ценность/токсичность	Следовые/ультраследовые
Натрий (Na)	Пищевая ценность	Мажорные/минорные
Олово (Sn)	Токсичность	Микроколичества/ следы
Цинк (Zn)	Пищевая ценность	Микроколичества/ следы

Таблица 8.3

Методы, используемые при мониторинге элементов в пищевых продуктах

Метод	Аббревиатура
Пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия	ПААС, <i>FAAS</i>
Атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией	ААС-ЭТА, <i>ETA-AAS</i>
Атомно-абсорбционная спектрометрия с генерацией гидридов	ААС-ГГ, <i>HG-AAS</i>
Атомно-абсорбционная спектрометрия холодного пара	ААС-ХП, <i>CV-AAS</i>
Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой	АЭС-ИСП, <i>ICP-AES</i>
Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой	МС-ИСП, <i>ICP-MS</i>
Ионоселективный электрод	ИСЭ, <i>ISE</i>
Анодная инверсионная вольтамперометрия	АИБ, <i>ASV</i>
Колориметрия	-
Нейтронно-активационный анализ	НАА, <i>NAA</i>

Загрязнение токсичными элементами

Все металлы, включая необходимые для жизни, при превышении безопасного уровня являются токсичными. Особую опасность представляют ртуть, свинец и кадмий [6, 7].

Тяжелые металлы могут попадать в пищу разными путями. Они могут поступать из почвы через корневую систему или из воздуха или аэрозолей на листья растений. Животные, потребляя загрязненные растения, воду или других животных, аккумулируют металлы в своих тканях. Загрязненная вода может использоваться при ирригации, в пищевой промышленности или при домашнем приготовлении пищи. Машины и аппараты, применяющиеся в пищевой промышленности, упаковочные материалы также могут содержать тяжелые металлы и загрязнять продукты. Примеси тяжелых металлов поступают в пищу как из природных источников, так и в результате человеческой деятельности. Дожди вымывают тяжелые металлы из горных пород и доставляют их в усвояемой форме в почву. Вулканические породы часто содержат большие количества ртути. К созданным человеком источникам тяжелых металлов относят удобрения, фунгициды, различные стоки, припои, клеи, использующиеся

в керамической промышленности, красители, загрязнения от использования содержащегося свинец бензина, выбросы электростанций, другие промышленные отходы, в частности, отходы целлюлозно-бумажных комбинатов. Следует отметить, что в последние 30-40 лет удалось значительно снизить уровень загрязнения окружающей среды. Так, во многих странах используется бензин, не содержащий свинца, разработаны эффективные методы очистки газовых выбросов и сточных вод, а ртуть- и свинецсодержащие фунгициды и пестициды замещены на более безопасные. Несмотря на это, загрязнение пищевых продуктов тяжелыми металлами остается серьезной проблемой, требующей постоянного внимания [8, 17].

В соответствии с действующими санитарными нормами СанПиН 2.3.2.1078 в Российской Федерации подлежат контролю следующие элементы: ртуть, свинец, кадмий, мышьяк, олово и хром. Олово и хром необходимо контролировать в консервированных продуктах в сборной жестяной таре.

8.2 Приготовление аналитического раствора

Количественный анализ минеральных веществ проводят, используя химические и физико-химические методы, которые требуют обязательной предварительной пробоподготовки. Для этого необходимо предварительно минерализовать анализируемый образец, используя один из двух способов: «мокрый» или «сухой» [21].

При сжигании продукта будет образовываться зола, которая дает представление об общем минеральном составе анализируемого образца. Для многих продуктов этот показатель нормируется.

Зола представляет собой остаток, образующийся после полного сжигания и прокаливания продукта. В процессе сжигания «органическая» составляющая (углерод, водород и частично кислород) образует углекислый газ и воду в виде пара, которая легко улетучивается. В золе сохраняются нелетучие компоненты в виде оксидов: кальций, магний, кремний, алюминий, железо, фосфор, калий, натрий и др. [9]. Для упрощения процесса минерализации образцов сжигание проводят медленно и при доступе воздуха. Возможно использование различных разрыхлителей, таких как ацетат кальция или карбонат магния. В процессе прокаливания анализируемых образцов происходят потери фосфора, серы, галогенов и щелочных металлов, что можно предотвратить, используя метод мокрого сжигания с использованием концентрированной серной или азотной кислоты, или их смеси.

Зольность пищевых продуктов определяют их предварительным высушиванием в сушильном шкафу, дальнейшим обугливанием на электрической плитке, а затем полным сжиганием при 450 °С в муфельной печи.

Массовую долю золы определяют по формуле 8.1

$$Z = \frac{m_1 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100 \%, \quad (8.1)$$

где m_1 – масса тигля с исследуемым продуктом, г; m_2 – масса тигля с золой, г; m_0 – масса тигля, г.

В процессе сбора, транспортировки, хранения и подготовки к анализу состав проб (образцов) не должен изменяться вследствие загрязнения, изменения содержания влаги или разложения. В частности, контейнеры, используемые на каждой стадии подготовки проб к анализу, не должны загрязнять пробу определяемыми элементами или абсорбировать эти элементы из пробы.

Для оценки питательных или токсических свойств элемента при его потреблении или усвоении анализируют съедобную порцию пищевого продукта. Для обеспечения сравнения с результатами, полученными из других источников, необходимо составлять подробное описание порций анализируемого пищевого продукта. Для фасованных продуктов такая порция обычно представляет собой все содержимое упаковки, но может включать специальные способы подготовки к потреблению, например, удаление жидкости. Для сырых продуктов подготовка может быть различной, что оставляет возможность выбора порции (например, возможная очистка яблок или картофеля). Для рыбы и морепродуктов может также потребоваться отдельная оценка порции. Тепловая или иная кулинарная обработка продукта перед его употреблением (например, удаление жира, добавление приправ) также очень важна для интерпретации результатов анализа. Промывка сырых продуктов водой (особенно овощей и зелени) – обычный этап приготовления пищи, поэтому для этой операции всегда должна использоваться вода, элементный состав которой сопоставим с определяемыми уровнями содержания элементов в порции. Обычно для этой цели используют деминерализованную воду.

Большинство методов определения элементного состава пищевых продуктов предусматривает разрушение их органического матрикса. Обычно это достигается путем сухого озоления или минерализацией с применением кислот-окислителей. Из полученного минерализата готовят аналитический раствор для введения в устройство, используемое для измерения концентрации элементов. Отчеты о квалификационных испытаниях, в которых суммируются полученные результаты за несколько лет, показывают, что в настоящее время наиболее часто используемыми процедурами минерализации для анализа тяжелых металлов (Pb, Cd, Hg, As, Sn) в пищевых продуктах являются сухое озоление, микроволновое (МВ-) нагревание в присутствии кислот, а также кислотная обработка при нагревании в открытых сосудах и в автоклавах.

В зависимости от анализируемого объекта применяют соответствующие ГОСТы или другие нормативные документы для отбора пробы и пробоподготовки.

Определения токсичных элементов в пищевых продуктах проводят с предварительной подготовкой, которая описана в ГОСТ 26929 «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения токсичных элементов». Настоящий стандарт распространяется на пищевое сырье и продукты и устанавливает способы сухой, мокрой минерализации и способ кислотной экстракции проб для последующего определения в них меди, свинца, кадмия, цинка, олова, железа, хрома, никеля, алюминия и мышьяка.

Гомогенизация

Исходную пробу гомогенизируют для получения однородной лабораторной пробы, аналитические пробы которой будут давать равнозначные аналитические результаты. Получение гомогенной смеси становится все более трудной задачей, поскольку для аналитических процедур используют малые аналитические порции, а измерения содержания элементов выполняются с высокой степенью точности. Кроме того, во многих случаях анализ пищевого продукта затруднен значительным объемом выборки, например, 12 большими контейнерами арахисового масла или 12 арбузами.

Процедуры гомогенизации могут быть различными в зависимости от агрегатного состояния и физических свойств пищевого продукта, а для получения лабораторной пробы, из которой будут взяты аналитические пробы, может потребоваться нарезка, смешивание, дробление, измельчение или раздавливание ручным или механизированным способом. Удаление воды из пищевого продукта сублимационной сушкой позволяет получить материал, который проще гомогенизируется. Недостатком сублимационной сушки являются потери некоторых микроэлементов.

У пищевых продуктов, для которых требуется использование гомогенизаторов, возможен риск загрязнения пробы вследствие абразивного истирания поверхности оборудования. Несмотря на то, что предотвращению загрязнения проб от оборудования необходимо уделять особое внимание, в настоящее время не существует надежных способов оценки этого вида загрязнений. Источник такого загрязнения не обнаруживается путем лабораторных анализов контроля качества продукции даже при использовании эталонов (стандартных образцов) или холостых проб. По возможности следует использовать оборудование, в котором поверхности, соприкасающиеся с пищевыми смесями, покрыты пластмассовым или другим незагрязняющим материалом, а также использовать лезвия из титана, а не из нержавеющей стали. Загрязнение от гомогенизирующего оборудования подтверждено экспериментально. На примере блюд для завтрака установлено загрязнение пробы элементами Fe, Zn, Cu, Pb, Cd и Cr от блендеров. В качестве способа снижения степени возможного загрязнения предложено промывать оборудование раствором 2%-ной этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, *EDTA*) и 2%-ной

лимонной кислоты. Изучено потенциальное загрязнение пшеницы 15 элементами (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, V и Zn) от гомогенизационного оборудования (фарфоровые и стеклянные ступки и четыре промышленно производимые мельницы). В зависимости от материала используемого оборудования обнаружено, что в пробу могут попадать по меньшей мере 10 элементов (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, и Pb). Сравнение загрязнений растительных материалов при использовании мельниц из агата и нержавеющей стали показало, что использование последних дает более высокие уровни загрязнений элементами Pb, Cd, Ni и Cr. Криогенное измельчение позволяет получать гомогенные материалы с низкими уровнями загрязнения. Пищевые продукты, которые трудно гомогенизировать с использованием традиционного оборудования, можно гомогенизировать с использованием криогенных измельчителей. Это оборудование позволяет решить проблемы гетерогенной структуры, связанные с анализом относительно малых аналитических проб. Первые сделанные на заказ криогенные системы вмещали только пробы массой до нескольких граммов, тогда как современное коммерческое оборудование может обрабатывать пробы массой до 100 г.

После гомогенизации лабораторная проба должна быть сразу извлечена из оборудования. Гомогенаты следует хранить в контейнерах, которые не загрязняют пробу. Если пробы необходимо замораживать, то они должны затем тщательно смешиваться перед аликвотированием аналитической пробы. Повторное замораживание и размораживание влияет на однородность пробы из-за изменения содержания влаги.

Сухое озоление

Способ сухой минерализации представляет собой полное разложение органических веществ путем сжигания пробы сырья или продуктов в электропечи при контролируемом температурном режиме и предназначен для всех видов сырья и продуктов, кроме животных, растительных жиров и масел (продуктов с содержанием жира 60 % и более) [22].

Метод атомно-адсорбционной спектроскопии при определении токсических элементов (кроме мышьяка) предполагает различные способы минерализации проб в зависимости от их влагосодержания.

Продолжительность процесса озоления составляет 10-15 ч, при этом будет образовываться белая или немного окрашенная зола без включений обугленных частиц. В случае мышьяка к пробе перед минерализацией добавляют оксид магния в количестве 10 % от массы навески в пересчете на сухое вещество, а также такое же количество спиртового раствора нитрата натрия. Дальнейшие операции будут аналогичны стандартному сухому озолению: высушивание пробы, ее обугливание и прокаливание.

Сухое озоление – стандартный метод, довольно давно применяемый для

подготовки пищевых продуктов к определению элементного состава.

Сухое озоление обычно проводят в муфельной печи с программируемой температурой. Для лучшего сохранения определяемых элементов можно использовать озолирующие добавки. При анализе процедур сухого озоления было отмечено, что сухое озоление обычно выполняют при максимальной температуре около 450-500 °С, а наиболее часто используемой для озоления добавкой является нитрат магния. Процедуры сухого озоления предусматривают сушку пробы перед озолением (иногда в конвекционной сушильной камере) и постепенное повышение температуры озоления во избежание разбрызгивания или возгорания. После начального озоления остаток растворяют в кислоте, иногда для получения безуглеродной золы может потребоваться повторное озоление. Присутствие нерастворимого осадка обычно указывает на присутствие оксида кремния, особенно при сжигании растительных материалов. Оксид кремния удерживает анализируемые элементы, и в этом случае требуется дополнительная обработка проб фтористоводородной кислотой. Сухое озоление обычно выполняют в сосудах из кварца, фарфора или (предпочтительнее) платины, а аналитические пробы имеют массу около 5-25 г. Для подготовки проб пищевых продуктов к определению F и I также применяется щелочное сухое озоление (или щелочное сплавление), при этом в качестве озолирующей добавки обычно используется гидроксид натрия или калия. Преимущество сухого озоления – возможность использования большой аналитической пробы, что сводит к минимуму трудности гомогенизирования. Кроме того, относительно большое количество проб может обрабатываться почти без участия оператора в течение нескольких суток – времени, необходимого для завершения озоления.

Проблемы сухого озоления связаны с летучестью некоторых элементов. Сухое озоление непригодно для подготовки проб пищевых продуктов к определению Hg из-за высокой летучести ртути. Для проб пищевых продуктов растительного происхождения установлено, что добавки нитрата магния препятствует образованию летучих соединений As и Se. Для определения As в наземных растениях озолирующая добавка не требуется. В процессе сухого озоления без озолирующей при 450 °С установлено взаимное загрязнение Pb и Cd. Результаты изучения влияния сухого озоления растительного материала на определение элементного состава свидетельствуют о потерях Al, Cr и V и возможном загрязнении Na при использовании фарфоровых тиглей. При использовании сухого озоления для анализа 13 элементов (Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Sr и Zn) в семи стандартных образцах пищевых продуктов методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-AES) наблюдались потери S и низкое улавливание Na и K.

Мокрое озоление

Способ мокрой минерализации, как было описано выше, представляет собой полное разрушение органических веществ анализируемого образца под действием азотной и серной концентрированных кислот при нагревании с добавлением хлорной кислоты или пероксида водорода. Завершение минерализации определяют по цвету раствора: он должен стать бесцветным или бледно-желтым и сохраняться после охлаждения. Избыточное количество кислот удаляют водой при кипячении в течение 10 мин (при этом должны выделяться белые пары). Мокрую минерализацию необходимо проводить в колбе Кьельдаля.

Кислотная экстракция (неполной минерализации) – экстракция токсичных элементов из анализируемого образца разбавленной соляной или азотной кислотой при кипячении. Данный вид минерализации нашел применение для определения токсических элементов в растительном и сливочном масле, маргарине, пищевом жире и сырах.

Метод анализа и вид определяемого токсичного металла будут определять способ приготовления раствора. Количественный анализ на содержания ионов металлов можно проводить методами атомно-абсорбционной спектроскопии, инверсионной вольтамперометрии и спектрофотометрии.

Конвекционное нагревание

Минерализация пищевых продуктов традиционно выполняется с использованием смесей минеральных кислот-окислителей: $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$, $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ или $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$. Для выполнения минерализации используют различные операции. В случае применения смеси кислот $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$ окисляющую смесь добавляют к аналитической пробе (2 г в сухом виде или 5-10 г в растворенной форме) в боросиликатной или кварцевой колбе Кьельдаля и проводят озоление при комнатной температуре в течение нескольких часов. Затем колбу постепенно нагревают до кипения. После того как вся HNO_3 прореагирует, в реакцию с любым остаточным органическим материалом вступает HClO_4 . Если на данной стадии происходит обугливание, нагрев прекращают и добавляют в колбу несколько капель HNO_3 , после чего снова продолжают нагревание. Эта процедура может повторяться несколько раз. После удаления продуктов восстановления HClO_4 (в виде белого дыма) озоление продолжают до появления белого дыма серного ангидрида. Такое озоление применялось для подготовки проб пищевых продуктов к определению йода. Недостатками этого способа озоления является большое количество используемых коррозионных реагентов и агрессивность HClO_4 . Кроме того, в настоящее время доступны озонирующие устройства высокого давления, использующие конвекционный нагрев в сосудах под давлением при высоких температурах, достигающих 320 °С.

Изучались смеси кислот $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$ и $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$, а также добавки HF к $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ при анализе различных проб пищевых продуктов в целях

определения Mn и Cr методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией (*ETA-AAS*). Было показано, что в обоих случаях достигается хороший результат, поэтому отпадает необходимость в добавках HF. Для анализа Al в пищевых продуктах методом *ICP-AES* необходима предварительная обработка HF перед началом минерализации. Разработана методика минерализации для эталонных материалов растительного происхождения с использованием процедуры нагревания на песчаной бане и МВ-озоление в открытом сосуде с добавками HF и испарением досуха. Полученные результаты сравнивались с результатами процедуры сухого озоления. Al, Ca, Cr, Cu, Fe, P, K, Na, Mg, Mn и Zn определяли методом *ICP-AES*, а Cd, Pb, Ni, Co, As и Se – методом *ETA-AAS*. Сфокусированное МВ-озоление (в открытом сосуде) без добавок HF приводит к неполному извлечению Al (60 %), Fe (87 %), Ca и Mg (90 %), Ni (80 %). Ртуть, содержание которой определялось методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара (*CP-AAS*), терялась при использовании HF и выпаривании пробы досуха. Тем не менее, использование песчаной бани или МВ-озоления с $H_2SO_4-H_2O_2$ для анализа ртути дало вполне удовлетворительные результаты. Было проведено сравнение двух способов минерализации ($HNO_3-H_2SO_4$ и $HNO_3-H_2O_2$) и сухого озоления (муфельная печь, 500 °C) для анализа рыбы и моллюсков (~10 г, растворенных до 25 мл) в целях определения Pb, Cu, Ni, Zn, Mn и Fe методом пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии (*EAAS*). Все три способа озоления оказались равно эффективными, за исключением заниженных результатов для Pb при использовании $HNO_3-H_2SO_4$ из-за осаждения сульфата свинца. Результаты, полученные при использовании $HNO_3-H_2O_2$ и *FAAS*, были сравнимы с результатами определения методом *ICP-AES*. При использовании минерализации смесью HNO_3-HClO_4 для анализа 12 элементов (Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Sr и Zn) методом *ICP-AES* в образцах семи пищевых эталонных материалах наблюдалось низкая степень извлечения Al, Na и K.

Методики озоления для Hg должны предотвращать потери Hg вследствие ее летучести. Для определения ртути методом минерализации обычно используется только HNO_3 или HNO_3 в сочетании с $HClO_4$ и/или с H_2SO_4 . Оценка 10 операций минерализации стандартных образцов пищевых продуктов и колбас, обогащенных неорганической ртутью методом *CV-AAS*, показала, что для предотвращения потерь ртути необходимо использовать герметичный сосуд или конденсатор и выполнять минерализацию при низкой температуре. Также были исследованы четыре наиболее часто используемые процедуры минерализации для определения содержания Hg в рыбе. Минерализацию выполняли в закупоренной колбе при максимальной температуре 90 °C. Для определения Hg использовали *CV-AAS*. Степень извлечения добавок неорганической Hg была высока во всех случаях, а органической Hg (например, CH_3HgCl) – только при использовании $HNO_3-H_2SO_4$ и $HNO_3-H_2O_2$. Основываясь на дополнительных

результатах, полученных для эталонных материалов, рекомендуется использовать $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$.

Микроволновой нагрев

В процедурах минерализации вместо традиционного нагревания все чаще применяется микроволновой нагрев. «Микроволновое озоление» (минерализация с использованием микроволнового излучения) выполняется в открытых или закрытых сосудах. Последние используются для снижения потерь летучих элементов и достижения более высоких температур. МВ-озоление предназначено для микропроб и требует меньшего количества реагентов. Продолжительность озоления намного меньше, чем в традиционных методиках, однако подготовка сосудов занимает больше времени. Имеется стандартный метод для анализа пищевых продуктов, использующий МВ-озоление.

Как и в случае других способов озоления, для восстановления Al необходимо использовать HF. Использование HNO_3 , $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ или $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2\text{-HF}$ в процедурах МВ-озоления для определения 13 элементов (Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Sr и Zn) в семи пищевых эталонных материалах (стандартных образцах) позволило получить хорошие результаты для всех элементов, за исключением трех образцов, в которых полное извлечение Al наблюдалось только при озолении смесью $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2\text{-HF}$. Результаты определения Cr в растительных объектах с помощью минерализации с использованием HClO_4 или H_2SO_4 с конвекционным или микроволновым нагреванием (концентрированное излучение, открытые сосуды) показали, что в некоторых материалах при использовании конвекционного нагревания с H_2SO_4 или микроволнового нагрева (концентрированное излучение, открытые сосуды) с любой окисляющей смесью потерь не было. При изучении МВ-озоления в закрытых и открытых сосудах на образцах зерновых культур для обоих методов были получены хорошие результаты при определении Cd, Cu, Pb и Se. Разработана методика МВ-озоления, в которой для минерализации различных пищевых продуктов используется единая программа с аналитической пробой массой от 0,41 до 9,5 г в зависимости от энергосодержания пищевого продукта. Единая программа использовалась для микроволнового озоления животных и растительных проб с сушкой (сублимационной или печной) и криогенным измельчением перед озолением 250 мг растительного или 300 мг животного материала. При изучении эффективности окисления при мокром озолении использовали четыре метода: минерализацию под высоким давлением, микроволновое озоление в закрытых кварцевых сосудах при повышенном давлении, МВ-озоление в закрытых тефлоновых сосудах при повышенном давлении и МВ-озоление в открытых сосудах при повышенном давлении. Остаточный углерод, включая некоторые органические соединения мышьяка, при 300 °C окислялся не полностью. Определение As из не полностью окисленных

соединений с использованием методов генерации гидридов (*HG*) не привело к хорошим результатам. Кроме того, остаточное содержание углерода может также влиять на точность измерений методом *ICP-AES* вблизи пределов обнаружения As и Se. Установлено, что в стандартных образцах мышечной ткани трески остаточное содержание углерода не влияет на точность результатов анализа других элементов (As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn и Zn).

8.3 Определение содержания токсичных металлов

Метод атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) характеризуется высокой чувствительностью, воспроизводимостью и селективностью [22]. Определение токсичных элементов этим методом осуществляется согласно ГОСТ 30178 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов». Настоящий стандарт распространяется на пищевое сырье и продукты и устанавливает метод определения свинца, кадмия, меди, цинка и железа. Количественное определение токсичных элементов проводят методом градуировочного графика. Для измерения абсорбции используют наиболее чувствительные линии поглощения элементов со следующими длинами волн: для свинца – 283,3 нм или 217 нм, для кадмия – 228,8, для меди – 324,8, для цинка – 213,9, для железа – 248,3 нм.

Для определения токсичных металлов широко используются вольтамперометрические методы из-за значительно более низкой стоимости оборудования по сравнению с оборудованием для атомно-абсорбционной спектроскопии. Вольтамперометрическое определение содержания токсичных элементов осуществляют согласно ГОСТ Р 51301 «Продукты пищевые и продовольственное сырье. Инверсионно-вольтамперометрические методы определения содержания токсичных элементов (кадмия, свинца, меди и цинка)» [22]. Настоящий стандарт распространяется на продукты пищевые и продовольственное сырье и устанавливает инверсионно-вольтамперометрические методы (ИВА) одновременного определения в них содержания токсичных элементов (кадмия, свинца, меди и цинка). В качестве индикаторного электрода в электролитической ячейке используют ртутно-пленочный на серебряной подложке, графитсодержащий, вращающийся дисковый стеклоуглеродный электрод или электрод из углеситала, электродом сравнения и вспомогательным электродом служат хлоридсеребряный электрод и стержень из углеситала соответственно. Предварительное электронакопление элементов из раствора проводят при потенциале накопления (–1,4) В, регистрацию вольтамперограммы осуществляют в диапазоне потенциалов от (–1,2) до (+0,05) В. Идентификацию каждого металла осуществляют по характеристическому значению потенциала полуволны, количественный анализ – по высоте волны. Концентрации элементов в испытуемой пробе определяют по методу добавок.

Диапазоны определяемых концентраций элементов, зависящие от вида пищевых продуктов и продовольственного сырья, приведены в табл. 8.4.

Таблица 8.4

Диапазоны определяемых концентраций элементов

Элемент	Диапазон определяемых концентраций, мкг/см ³	
	ААС	ИВА
Свинец	0,1-10,0	0,02-50
Кадмий	0,02-1,0	0,002-5,0
Медь	0,05-5,0	0,6-200
Цинк	0,1-10,0	1,0-400
Железо	0,1-10,0	—
Мышьяк	0,001-0,020	0,001-10,0

Метод атомно-абсорбционной спектроскопии

Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС, ААС) является одним из традиционных методов, все еще используемых для определения элементов в пищевых продуктах. Для большинства определяемых этим методом элементов требуются корректоры фона (обычно используют дейтериевый или зеемановский корректоры, а также устройства Смита-Хифтджа), встраиваемые в современные аналитические приборы. Атомно-абсорбционные методы применяются при анализе пищевых продуктов во многих лабораториях, использующих пламенную атомно-абсорбционную спектроскопию (FAAS) или ETA-AAS для нутриентов, ETA-AAS для Cd и Pb, HG-AAS или ETA-AAS для As и Se, CV-AAS для Hg.

Пламенная атомно-абсорбционная спектроскопия

Для определения многих нутриентов и некоторых токсинов, присутствующих в пищевых продуктах, можно использовать FAAS. Аналитические растворы пневматически распыляют в пламя ацетилен-воздух или ацетилен-закись азота (в зависимости от определяемого элемента). Аналитические растворы подготавливают путем минерализации или сухого озоления. Для повышения предела обнаружения некоторых элементов в пищевых продуктах может потребоваться обогащение аналитического раствора путем комплексообразования и экстракции растворителем. Инструментальные средства FAAS относительно просты в работе, и при одновременном определении нескольких элементов анализ при помощи FAAS выполняется быстрее, чем более сложными методами многоэлементного анализа. FAAS используется в качестве стандартного метода определения микроэлементов.

FAAS с генерацией гидридов использовали для определения в пищевых продуктах Na, K, Mg, Ca, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sn, As и Se. Показана возможность применения FAAS при сухом озолении или минерализации для анализа пищевых продуктов на элементы (Ca, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn и Zn).

Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

АЭС-ИСП (*ICP-AES*) обычно используется для анализа пищевых продуктов, особенно для определения макрокомпонентов и минорных элементов. Возможность многоэлементного определения делает этот метод полезным для диетологических исследований. Совершенствование приборного оснащения, включая системы с аксиально наблюдаемой плазмой и устройства переноса заряда, работающие как двухмерные детекторы, повысило полезность АЭС-ИСП. Эти устройства переноса заряда делают намного удобнее выполнение необходимой оценки фоновой эмиссии и мешающего влияния. АЭС-ИСП используется в ряде стандартных методов, предназначенных для определения Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Na и Zn в детских смесях, B, Ca, Si, K, Mg, Mn, P и Zn в растениях, P в животных и растительных жирах и маслах (табл. 8.5).

При анализе информации о влиянии матрикса на АЭС-ИСП, вызванном макроэлементами, было сделано заключение, что до сих пор нет ясного понимания механизма, ответственного за эти мешающие влияния, и необходимы более эффективные методы для преодоления этого типа помех. Предполагается, что количественный анализ методом стандартных добавок является лучшим методом исключения влияния матрикса в АЭС-ИСП.

Таблица 8.5

Информация о результатах исследований элементного состава пищевых продуктов с использованием АЭС-ИСП

Пищевые продукты	Элементы
Общие рационы	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, K, P, Na, Zn
Составные блюда	Al, B, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, Na
Детские смеси	Al, Ag, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, U, V, Zn
Фрукты, соки и сокосодержащие напитки	Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, V, Zn
Съедобные грибы	Al, Ca, K, Mg, Na, P, Si
Рис	Al, Ca, Si, Fe, K, Mg, Mn, P, Zn
Апельсиновый сок	Al, B, Ca, Fe, Mg, P, K, Si, Na, Sr, Ti
Чайные напитки	Al, Ba, Ca, Si, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr, Zn

При оценке потенциального влияния на количественный анализ 24 элементов предложено использовать стандартные добавки. В ходе изучения влияния на АЭС-ИСП четырех неорганических кислот (HCl, HNO₃, H₂SO₄, HClO₄) оказалось, что их совместный эффект более сложный, чем простое

сложение их одиночных эффектов. Для устранения влияния HNO_3 на АЭС-ИСП использовали горячую вертикальную циклонную распылительную камеру и трубную сушилку с полупроницаемой мембраной.

Метод АЭС-ИСП применим для анализа пищевых продуктов на Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, P, V и Zn с использованием процедур сухого или мокрого озоления. Описано применение этого метода для определения 20 элементов в пищевых продуктах с использованием аналитической пробы, взятой с учетом энергосодержания пищевого продукта и обработанной по единой программе МВ-озоления. Метод АЭС-ИСП также применяли для определения 13 элементов в образцах пищевых продуктов растительного и животного происхождения, используя единую программу МВ-озоления. Перед озолением фиксированной массы образцов их предварительно сушили и измельчали. Разработан метод измерения Ti в пищевых продуктах с использованием АЭС-ИСП, в целях оценки содержания двуоксида титана (пищевой добавки). Для озоления проб использовали H_2SO_4 , нагретую до 250 °С. Валидация метода определения Sn в консервах с помощью АЭС-ИСП показала, что применяемые процедуры микроволнового озоления и озоления под высоким давлением дают сравнимые результаты.

Эффективность метода АЭС-ИСП для определения Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, I и Zn в детских смесях можно повысить путем распыления суспензии с использованием смеси третичный амин: ЭДТА. Эта процедура позволяет повысить общую стабильность суспензий для разнообразных образцов, улучшить прецизионность, а также повысить степень извлечения Ca, Mg, Cu, Zn и P.

Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

Метод МС-ИСП, появившийся в начале 1980-х гг., в настоящее время представляет собой распространенный метод анализа элементного состава пищевых продуктов, позволяющий детектировать элементы в следовых и ультраследовых количествах. Чувствительность метода на два-три порядка выше, чем у ААС-ИСП, однако аппаратное оснащение дороже и сложнее. Недостатком данного метода является возможная спектральная интерференция молекулярных форм. Для подавления изобарных интерференций в квадрупольной МС-ИСП в настоящее время используют коллизионно-реакционные или динамические реакционные ячейки. МС-ИСП с двойной фокусировкой по-прежнему остается лучшим средством преодоления таких изобарных интерференций, однако стоимость аппаратуры значительно выше, чем для других вариантов МС-ИСП.

Для анализа 13 элементов в образцах пищевых эталонов была использована квадрупольная МС-ИСП. Пробоподготовка включала озоление смесью HNO_3 - H_2O_2 в кварцевых трубах с максимальной температурой нагревательного блока, установленной на 100 °С. Для устранения мешающего влияния Ca на

определение Fe использовался поправочный коэффициент. Разработана методика высокопроизводительного определения 15 элементов в эталонных материалах и образцах пищевых продуктов с использованием квадрупольной МС-ИСП и МВ-озоления. При этом спектральные интерференции, вызванные С, С1 и Са, учитывались путем использования поправочных коэффициентов. Исследована возможность применения МС-ИСП с двойной фокусировкой для определения 15 элементов в молочных продуктах с использованием МВ-озоления. МС-ИСП с двойной фокусировкой преодолевает многие полиатомные интерференции, имеющие место при использовании квадрупольной МС-ИСП.

Электрохимические методы

Рутинный анализ элементов в пищевых продуктах проводят в основном с помощью спектрометрических методов, а электрохимические методы используют в этих целях достаточно редко. Исключение составляет анализ фтора с помощью ионоселективных электродов (ИСЭ). Вместе с тем некоторые электрохимические методы, например, инверсионная вольтамперометрия, представляют собой реальную альтернативу для определения многих элементов в пищевых продуктах. Метод ИСЭ применяется в ряде стандартных методик для определения йода в детских смесях и фтора в растительных объектах. Cd и Pb в пищевых продуктах определяют с использованием анодной инверсионной вольтамперометрии. С помощью полярографии определяют содержание Zn во фруктах и овощах. Для определения Cd, Cu и Pb в кофе использовалась дифференциально-импульсная анодная инверсионная вольтамперометрия. Анодная инверсионная вольтамперометрия применялась для определения Hg в грибах, а с помощью переменного-токовой полярографии определяли Cr, Pb и Zn в сгущенном молоке.

Разработан простой метод для определения F в пищевых продуктах с использованием щелочного озоления с гидроксидом натрия и дальнейшего определения фтора с помощью ИСЭ. Было исследовано влияние на полученные результаты таких факторов, как масса пробы и время хранения аналитического раствора. Валидация метода проводилась путем анализа эталонных материалов, морепродуктов, чая и восстановления добавленного F в образцы.

Инверсионная вольтамперометрия и потенциометрическая инверсионная вольтамперометрия применялись для определения Sn во фруктовых соках. Подготовка аналитического раствора включала добавление к соку HNO₃ и HCl и разбавление водой. Продолжительность анализа составила около 10 мин. Результаты, полученные с помощью обоих электрохимических методов, удовлетворительно согласовывались с результатами, полученными методом FAAS. В методе, разработанном для определения Sn в консервированных фруктовых соках, использовали полярографию с наложением переменного потенциала в растворе щавелевой кислоты и метиленового голубого.

Минерализацию соков осуществляли с помощью HNO_3 . Результаты определения Sn соответствовали результатам, полученным спектрофотометрическим методом.

Колориметрия

Колориметрия применяется для рутинного анализа йода в пищевых продуктах, при этом используют либо метод Моксона-Диксона [3], основанный на каталитическом действии йодида на разрушение тиоцианат-иона нитрит-ионом и использующий щелочное сухое озоление при подготовке проб, либо метод Фишера, основанный на йодидкатализируемом восстановлении Ce (IV) в присутствии As (III) и использующий минерализацию при подготовке проб. Оба метода требуют наличия автоматизированных анализаторов. Метод Моксона-Диксона был модифицирован для анализа неорганического йода в обогащенных кулинарных продуктах. Для этого была снижена скорость колориметрической реакции, что позволило детектировать йод без автоматизированного анализатора и свести подготовку проб к обычной водной экстракции. Результаты этого метода оказались сопоставимыми с результатами, полученными при использовании метода МС-ИСП.

Контрольные вопросы

1. Содержание каких элементов в пищевых продуктах регламентировано?
2. Какие методы используются при мониторинге элементов в пищевых продуктах?
3. Каковы допустимые уровни содержания тяжелых металлов в различных продуктах?
4. Опишите пробоподготовку при «сухом» и «мокром» озолении.
5. Какие современные методы используются при определении содержания токсических металлов?

9 ВИТАМИНЫ

Витамины – это органические соединения, необходимые для поддержания и регулирования важнейших биохимических реакций в человеческом организме для его роста, здоровья и размножения. Витамины, как правило, в организме не синтезируются, поэтому должны поступать с пищей. Недостаток этих соединений в рационе выражается в очевидных симптомах дефицита витаминов. Витамины не являются источниками энергии, однако помогают преобразовывать жиры и углеводы в энергию и способствуют формированию костей и тканей [10].

Витамины подразделяют на две группы: жирорастворимые – А (ретинол), D (кальциферол), Е (токоферол) и К, и водорастворимые – В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), В₆ (пиридоксин), пантотеновая кислота, фолат (фолиевая кислота), В₁₂ (цианокобаламин), биотин, витамин РР (ниацин или никотиновая кислота) и витамин С (аскорбиновая кислота).

Чем больше мы знаем о витаминах, тем становится очевиднее, что различия между этими двумя группами (водорастворимыми и жирорастворимыми витаминами) сводятся не только к их растворимости. Хотя механизмы действия жирорастворимых витаминов менее изучены по сравнению с водорастворимыми, известно, что коферментная активность жирорастворимых витаминов отличается от таковой у водорастворимых. В отличие от энергетических компонентов пищи витамины необходимы организму только в микроколичествах. Энергетические компоненты пищи – сахара, жиры – в рационе присутствуют в относительно больших количествах.

Баланс витаминов важен также для выполнения их функций. Известно, что избыток витаминов может вызывать те же симптомы, что и их дефицит. Водорастворимые витамины не депонируются в организме в значительных количествах, поэтому для поддержания их адекватных уровней они должны ежедневно поступать с пищей или в виде биологически активных добавок. В условиях, препятствующих их поступлению в организм или усвоению, быстро исчерпываются запасы водорастворимых витаминов. Жирорастворимые витамины лучше депонируются в организме, поэтому их содержание может достигать токсичных уровней. Многие витамины действуют комплексно, регулируя несколько процессов в организме. Дефицит витаминов в рационе, не обеспечивающем необходимые их количества, может нарушить внутренний баланс организма или заблокировать одну или несколько метаболических реакций. Так, дефицит витамина В₁ вызывает бери-бери – болезнь, приводящую к атрофии, слабости ног, поражению нервной системы и сердечной недостаточности. Дефицит витамина С вызывает цингу – болезнь, которая характеризуется спонтанными кровоизлияниями. Специфических болезней, однозначно связанных с дефицитом витамина В₆, рибофлавина или пантотеновой кислоты, не выявлено, хотя можно ожидать, что в организме людей, которые

голодали или в течение нескольких месяцев плохо питались, будет обнаруживаться недостаток большинства питательных веществ, в том числе витаминов В₂, В₆ и пантотеновой кислоты. Дефицит ниацина вызывает пеллагру, симптомы которой включают высыпания на коже и паршу, диарею и депрессию. Дефицит витамина В₁₂ наблюдается при отказе от потребления мяса и молока или других молочных продуктов. При гиповитаминозе В₁₂ наблюдается анемия, а в запущенных случаях могут возникать необратимые нарушения нервной системы. Умеренный дефицит фолата наблюдается во всем мире и может быть следствием недостаточного потребления зеленых листовых овощей, фруктов и фруктовых соков.

9.1 Методы анализа витаминов

Качественный и количественный анализ витаминов в пищевых продуктах, плазме и сыворотке крови, а также в лекарственных препаратах играет важную роль при оценке пищевой ценности продуктов, а также в медицинской и фармацевтической практике для профилактики или контроля здоровья людей. Возросший интерес к правильному питанию, а также кормлению животных означает осведомленность о жизненно важной роли, которую витамины играют в физическом развитии и состоянии здоровья. В последнее время значительно увеличилось потребление фруктов и овощей, а также витаминизированных и консервированных продуктов. В процессе производства и хранения пищевых продуктов, а также в результате протекания различных химических реакций витамины могут теряться, поэтому чрезвычайно важно иметь доступные препараты для восполнения возможной нехватки витаминов в повседневном рационе. В этой связи широко используются поливитаминные препараты. Эти факты, а также законодательные требования к маркировке пищевых продуктов, обуславливают потребность в очень точных аналитических методах контроля качества этих сложных препаратов. В сложившейся ситуации очень актуальной стала разработка точных и эффективных аналитических методов определения количества витаминов. Тем не менее, значительную проблему до сих пор представляет нестабильность и сложность пищевых матриц, в которых обычно приходится определять витамины.

Процесс совершенствования методов количественного определения витаминов продолжается. Попытки определить количество жирорастворимых и водорастворимых витаминов в образцах пищевых продуктов привели к появлению самых разных методов. Данные о количественном определении витаминов основываются на косвенном определении лечебных доз посредством биопроб. Стандартные и официальные аналитические методы зачастую трудоемки, иногда длительны, обладают низкой специфичностью и предполагают предварительную обработку образцов с помощью сложных химических, физических или биологических реакций для устранения обычно

присутствующих мешающих веществ. Методика обработки, как правило, индивидуальна для каждого отдельного вида витаминов.

Методы определения витаминов включают спектрофотометрические, полярографические, флуориметрические, ферментативные и микробиологически операции [25]. В дополнение к колориметрическим методам используются титриметрия, вольтамперометрия, флуорометрия, потенциометрия, радиоиммуноанализ (*RIA*), иммуноферментный анализ, кинетическая хемилюминесценция (*CL*), проточно-инжекционный анализ и хроматография. Отдельные витамины и определенные сочетания двух или трех видов витаминов можно хроматографировать в изократическом режиме. Для одновременной хроматографии более сложных смесей может потребоваться программа градиентного элюирования. Для определения витаминов наряду с другими методами используют ионообменную (*IEC*), нормально-фазовую, ион-парную или обращенно-фазовую хроматографию – последняя является самым распространенным методом. В большинстве опубликованных хроматографических методов используют сложные буферизированные подвижные фазы. В сочетании с хроматографическими методами применяют различные методы детектирования, например, электрохимическое, флуориметрическое детектирование и детектирование по поглощению ультрафиолетового или видимого света с единственной или переменной длиной волны или фотодиодной матрицей.

Высокоэффективный капиллярный электрофорез – относительно новый метод разделения, имеющий несколько преимуществ по сравнению с обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ-ВЭЖХ). Его преимущества – более высокие эффективность и разрешение, относительная простота и возможность использования различных методик, разработанных для заряженных и незаряженных аналитов при капиллярном электрофорезе в свободной зоне и мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографии. С помощью мицеллярной электрокинетической хроматографии или капиллярного зонного электрофореза проводят анализ витаминов в различных видах фармацевтических составов – таблетках, инъекциях, сиропе и желатиновых капсулах.

Все чаще для анализа витаминов используют масс-спектрометрию (МС), которую можно сочетать с другими методами разделения, например, с газо-жидкостной хроматографией, ВЭЖХ и капиллярным электрофорезом (КЭ). Комбинированный метод ЖХ-МС позволяет разделять нелетучие термолабильные вещества для последующего масс-спектрометрического детектирования. Результаты исследований витаминов методом ЖХ-МС показали, что этот комбинированный аналитический метод имеет значительный потенциал для идентификации и определения витаминов.

Операции подготовки проб

Витамины, которые обычно встречаются в пищевых матриксах, сыворотке и плазме крови в следовых количествах, трудно анализировать, если эти матриксы содержат мешающие вещества. Для разнообразных пищевых матриксов разработаны эффективные методы экстракции, очистки и количественного анализа витаминов. В большинстве случаев эти методы требуют дополнительной модификации для выполнения конкретных анализов, поэтому в каждом отдельно взятом случае особое внимание следует уделять правильной подготовке пробы и разделению ее компонентов.

В случае анализа витаминов в пищевых продуктах процесс подготовки проб определяет точность, прецизионность и пределы обнаружения целевого компонента при выполнении количественного анализа и зачастую является этапом, определяющим скорость анализа. Вододисперсные образцы продуктов подвергают обработке для выделения и концентрирования органических аналитов из матрикса образца, получая экстракт для последующего инструментального анализа. Зачастую этот этап пробоподготовки является самым важным в аналитическом цикле. Иммуноанализ и микробиологические методы позволяют обнаружить даже очень малые количества витаминов в сыворотке, плазме и образцах пищевых продуктов и являются достаточно специфическими. В связи с этим они не требуют тщательной очистки проб, но занимают много времени и имеют ограниченную прецизионность. Флуорометрические и спектрофотометрические методы требуют дополнительной предварительной обработки для отделения водо- и жирорастворимых витаминов от мешающих веществ. Для очистки экстрактов используют различные хроматографические процедуры (колоночная и бумажная хроматография, тонкослойная хроматография).

Методы экстракции, разработанные для определения свободных форм витаминов, более разнообразны. Некоторые авторы рекомендуют химические методы, другие предпочитают обработку кислотной фосфатазой или такадиастазой, иногда в сочетании с α -глюкозидазой. В некоторых случаях ферментативной обработке предшествует гидролиз неорганическими кислотами. Первый этап анализа – экстрагирование из образца – выполняется с использованием либо сильной кислоты или щелочи, либо органического растворителя в сочетании с нагреванием. Этот этап необходим в случае твердых пищевых материалов. Следующий этап – ферментативная обработка – выполняется для высвобождения любых витаминов, связанных в пищевой матриксе с белками и другими компонентами.

Химики-аналитики продолжают поиск более быстрых, удобных, безопасных и менее затратных процедур пробоподготовки, обеспечивающих получение точных и прецизионных данных с приемлемыми пределами обнаружения. Для определения витаминов в водных образцах разработаны методы твердофазной

экстракции (ТФЭ) для замены традиционных методов жидко-жидкостной экстракции (ЖЖЭ). ТФЭ используется как метод разделения витаминов на две фракции (водорастворимую и жирорастворимую), если они одновременно присутствуют в одной пробе. Затем определяют содержание витаминов, используя химические, микробиологические методы или ВЭЖХ. Перед выполнением анализа с помощью ВЭЖХ также используют процедуры очистки проб для устранения мешающих соединений. Применение сверхкритических жидкостей для подготовки проб при анализе витаминов может рассматриваться как альтернатива использованию органических растворителей. Основные преимущества использования сверхкритических жидкостей по сравнению с традиционными органическими растворителями – это минимальный расход растворителей, исключение контакта с кислородом и низкие температуры. Современная сверхкритическая флюидная экстракция предполагает более быструю экстракцию, потенциально более высокую селективность и пропускную способность (благодаря автоматизированному аппаратному оснащению), чем традиционные методы экстракции органическими растворителями. Хроматографический аналог сверхкритической флюидной хроматографии позволяет разделять соединения со значительно различающейся полярностью и молекулярной массой и избавляет от необходимости дериватизации витаминов.

9.2 Жирорастворимые витамины

Жирорастворимые витамины очень важны в питании человека. Они состоят из различных классов химических соединений (ретиноиды, олефины, D₂, D₃) и их предшественников, токоферолы, токотриенолы, менадион и менахиноны), которые согласно обладают выраженной биоактивностью. Эти соединения реагируют с другими соединениями, присутствующими в клеточных мембранах пищевых продуктов и кормов посредством образования физических, химических или ковалентных связей. Характер этих связей оказывает влияние на биодоступность этих веществ.

Традиционным общепринятым методом определения жирорастворимых витаминов является биоанализ. Истинную биологическую активность жирорастворимых витаминов определяют по их способности предотвращать или устранять специфические симптомы дефицита жирорастворимого витамина *in vivo*. Для определения жирорастворимых витаминов широко используют биохимические и гистологические методы. Концентрации жирорастворимых витаминов в большинстве образцов пищевых продуктов, крови и сыворотке довольно низкие. Эти витамины обычно обнаруживаются в присутствии больших количеств мешающих веществ (например, стероидов, триглицеридов, фосфолипидов). Появление ВЭЖХ, ГХ, КЭ и tandemных методов (например, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС) вызвало стремительное развитие методов анализа жирорастворимых витаминов. В настоящее время общепризнано, что активность

витамина А в пищевых продуктах и биологических образцах лучше всего определять путем хроматографического разделения каротиноидов и последующего суммирования активности его различных изомерных форм. Традиционные методики, например, реакция Карр-Прайса с треххлористой сурьмой, давали слишком завышенные результаты и не позволяли различить *цис*- и *транс*-изомерные формы этих соединений.

За последние годы ВЭЖХ стала более предпочтительным методом при анализе изомеров витамина Е по сравнению с ГХ благодаря большей гибкости и удобству при работе с различными матриксами. Первая стадия рутинного анализа витамина Е в пищевых продуктах – выделение витамина из образца посредством омыления, однако в случае экстрагирования витамина Е из биологических жидкостей эта процедура не требуется. После этой стадии следует экстракция и упаривание экстракта, затем полученный остаток перед инъекцией в колонку снова смешивают с растворителем, совместимым с подвижной фазой.

Из-за малой концентрации витамина К в физиологических жидкостях, отсутствия специфических и чувствительных свойств, процесса химической дериватизации или *RIA* требуется разработка эффективных методов ВЭЖХ, по меньшей мере, с двумя последовательными стадиями разделения, чтобы обеспечить нужную чистоту и достаточно высокую концентрацию для точной количественной оценки витамина К с использованием флуорометрического или электрохимического детектирования.

Для анализа витамина D в сыворотке крови в течение буквально последних двух десятилетий появились высокоэффективные методы, основанные на конкурентном связывании с белком и последующем радиорецепторном анализе с использованием [³H] метаболитов. Эти методы основаны на экстенсивной предварительной очистке экстрактов с помощью ЖХ или ТФЭ. За прошедшие 10 лет для анализа жирорастворимых витаминов чаще всего использовались методы ВЭЖХ, несмотря на появление усовершенствованных модификаций методов СФХ.

9.3 Водорастворимые витамины

В наши дни наиболее распространенным методом анализа витамина С является ВЭЖХ, которая лишена основных недостатков химических методов в присутствии мешающих веществ и характеризуется высокой точностью, селективностью и чувствительностью. Это единственный метод, который позволяет раздельно определить *L*- и *D*-изомеры витамина С. Существует широкий диапазон методов ВЭЖХ, например ОФ-ВЭЖХ, нормально-фазовая ВЭЖХ, ионообменная и ион-парная хроматография с различными колонками (C₁₈, NH₂) и детектированием (ультрафиолетовым, флуоресцентным, кулонометрическим).

Определение *L*-аскорбиновой кислоты и *L*-дегидроаскорбиновой кислоты (ее

окисленной формы) в сыворотке и плазме крови, лекарственных препаратах и пищевых продуктах заслуживает особого внимания. Трудности количественного анализа витамина С связаны со следующими факторами: витамин С легко окисляется, поэтому пробы плазмы необходимо сразу ацилировать и замораживать; многочисленные методики анализа основаны на различных фундаментальных принципах; не существует материала для контроля качества с сертифицированными уровнями *L*-аскорбиновой кислоты, который может использоваться в качестве внутреннего стандарта при валидации метода. До сих пор все еще применяются методы, которые позволяют определять только либо восстановленные, либо окисленные формы витамина С.

В настоящее время витамин С определяют отдельно, широко используя различные аналитические методы, включая колориметрию, титриметрию, ультрафиолетовую спектрофотометрию (2,6-дихлорфенолиндофенол, 2,4-динитрофенилгидразин), кинестическую хемиллюминесценцию (Cu(II)-люминол, Ce(IV)-родамин6G, Fe(II)-люминол-O₂, KMnO₄-люминол, H₂O₂-гемин-люминол и H₂O₂-люминол-пероксидаза), а также кинетические, электрохимические (полярография, твердоэлектродная вольттамперометрия, амперометрия), флуориметрические (ортофенилендиамин), хроматографические (ВЭЖХ-УФ-поглощение, флуоресценция, диодная матрица электрохимическое детектирование, ГХ-пламенно-ионизационный детектор, электронно-захватный детектор, азотно-фосфорный детектор, хроматография на бумаге, тонкослойная хроматография) и другие спектроскопические методы (инфракрасная фотоакустическая и рамановская Фурье-спектроскопия).

Существует множество аналитических методов обнаружения витамина С, но не один из них не может считаться полностью удовлетворительным из-за недостаточной специфичности и проблем, связанных с многочисленными мешающими веществами, содержащимися в большинстве пищевых продуктов. Многие из этих методов исследованы на пригодность для анализа биологических жидкостей (проб мочи и крови). Содержание аскорбиновой кислоты в моче имеет ограниченное значение, но измерение содержания витамина С в крови важно, так как отражает статус витамина С в организме. В связи с этим требуются методы анализа витамина С, которые могут дать точные и прецизионные данные без потери чувствительности и селективности. Имеется опыт определения витамина С в огромном масштабе с помощью метода ГХ. Для анализа пищевых продуктов и лекарственных препаратов получили заслуженное признание метод рамановской спектроскопии с преобразованием Фурье благодаря ее превосходной прецизионности, хорошего соотношения «сигнал-шум» и минимального времени получения данных.

Витамины группы В

Первые аналитические методы, разработанные для определения витаминов группы В, были выполнены на образцах крови и тканей подопытных животных,

после чего появились микробиологические методы. Витамин В₆ (тестовый организм – *Saccharomyces carlsbergensis*), фолиевая кислота (*Lactobacillus casei*), витамин В₁₂ (*Lactobacillus leichmannii*), пантотеновая кислота (*Lactobacillus plantarum*), пантотеновая кислота (*Allescheria boydii*) обычно анализируют микробиологическими методами. По определению витаминов группы В имеется много информации с широким разнообразием применяемых методов, включая микробиологические, классические гравиметрические и титриметрические методы, спектрофотометрию, спектрофлуорометрию, кинестическую хемилюминесценцию, потенциометрию, капиллярный электрофорез, хроматографию (тонкослойную, газовую, ВЭЖХ) и тандемные методы (ВЭЖХ-МС, ГХ-МС и т.д.).

Тем не менее, многие из этих методов недостаточно селективны, сложны, трудоемки, и для них необходимы дорогостоящая аналитическая аппаратура или опасные реагенты. Гравиметрический метод анализа, титрование и многие электрохимические методы анализа пригодны лишь для определения некоторых витаминов группы В при высоком их содержании. Известны примеры использования методов ТСХ, ГХ и КЭ для определения витаминов группы В. В настоящее время самыми распространенными методами являются ВЭЖХ, флуорометрия и спектрофотометрия. Флуорометрия особенно полезна в фармацевтическом анализе, и слабые флуоресцентные свойства многих витаминов и витаминopodobных соединений привели к созданию реагентов, способствующих образованию их флуоресцентных производных. Наиболее широко используемый метод определения тиамин – это так называемый тиохромный метод, основанный на окислении тиамин в щелочной среде и экстракции образовавшегося тиохрома из водной в органическую фазу с последующим флуорометрическим анализом. Рибофлавин обычно определяют флуорометрическим путем измерения интенсивности характерной желтовато-зеленой флуоресценции. Для определения ниацина образцы сначала подвергают гидролизу серной кислотой для образования никотиновой кислоты из его промежуточных форм. Пиридиновое кольцо никотиновой кислоты разрывается бромцианом, и продукт деления соединяется с сульфаниловой кислотой, образуя соединение, окрашенное при 470 нм в желтый цвет. ВЭЖХ, используемая для определения витаминов группы В и их изомеров, характеризуется высокой чувствительностью, хорошей селективностью и возможностью одновременного определения нескольких компонентов. Методы ВЭЖХ широко использовались для изучения этой группы витаминов и применялись для разделения и определения сложных образцов лекарственных препаратов, крови, сыворотки и пищевых продуктов.

Контрольные вопросы

1. К каким заболеваниям ведет дефицит или отсутствие тех или иных витаминов в организме человека?
2. В чем причина актуальности разработки точных и эффективных аналитических методов определения количества витаминов?
3. Какие основные методы используют при определении содержания витаминов в пищевых продуктах и биологических объектах?
4. Опишите основные процедуры, которые проводят в процессе пробоподготовки образцов при анализе на содержание витаминов.
5. Дайте характеристику спектрометрическому методу определения содержания витамина А в пищевых продуктах.
6. Какова основная функция витамина D в организме человека?
7. Какие методы определения витамина D используются в настоящее время?
8. Опишите основные методы определения витамина С в пищевых продуктах.
9. Что такое «реакция Кёнига», и для анализа какого витамина она применяется?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современных условиях высокое качество продукции является одним из главных факторов успеха предприятий пищевых отраслей, обеспечения их конкурентоспособности, экономической эффективности.

Обострение конкурентной борьбы на рынке понуждает производителей изыскивать пути обеспечения конкурентных преимуществ. Мировой опыт показывает, что они достигаются не только за счет снижения издержек и цен, но в первую очередь за счет более высоких качественных свойств и характеристик продукции, услуг, способных удовлетворить запросы потребителей.

В рыночных условиях примат, главенство потребителя позволяют раскрыть категорию качества через призму удовлетворения его потребностей. Именно потребитель, его потребности и ожидания должны быть помещены в центр внимания производителя, служить ориентиром для всей производственно хозяйственной деятельности предприятия, организации, фирмы. Удовлетворенность потребителя является залогом востребованности продукции и самого предприятия, стабильности его функционирования, результативности всей его деятельности в целом.

Многие зарубежные и отечественные фирмы, предприятия, добившиеся значительных успехов в производственной, торговой, инновационной и других сферах деятельности, выдвигают высокое качество и его нацеленность на конкретного потребителя как приоритет текущей деятельности и императив стратегического развития.

Однако несправедливо было бы считать, что понятие качества свойственно исключительно рыночной экономике и что в годы плановой экономики проблематике качества не уделялось должного внимания. Напротив, в этой сфере были достигнуты определенные успехи, однако в рамках существовавшей политико-экономической информации сам характер обеспечения качества, резервы и направления его повышения были сугубо специфическими и потому при смене экономической модели оказались не вполне применимы.

В связи с этим как нельзя более востребованным стал опыт управления качеством наиболее прогрессивных зарубежных государств с развитой агропромышленной и перерабатывающей инфраструктурой. Его изучение, а также адаптация к российским условиям послужили основой поступательного движения нашей страны по пути совершенствования деятельности в области качества, ее гармонизации с международными нормами и практикой, позволили активнее включиться в интеграционные процессы, разворачивающиеся в мировой экономике. Но и по сей день некоторым вопросам качества недостает изученности и научного внимания, что придает им чрезвычайную актуальность с учетом реалий современного этапа развития экономики.

В то же время высокий уровень качества невозможно обеспечить ценой единичных, разовых усилий отдельных исполнителей, подразделений, руководителей. Необходим системный, комплексный подход к решению проблем качества, который на практике убедительно доказал свои преимущества.

Такой подход ставит целью не борьбу с дефектами, браком, несоответствиями, а исключение самих условий, предпосылок их возникновения на всех стадиях и этапах жизненного цикла продукции, от производства сырья до конечной потребительской продукции. Он должен осуществляться во всех видах деятельности, всеми работниками, обеспечивая не только высокое качество продукции, но и его гарантии, доказательства потребителю.

Совершенствование методов контроля качества продукции позволит повысить качество пищевых продуктов и удовлетворить возрастающий потребительский спрос на продукции.

Владение современными методами контроля продукции позволит обучающимся внедрить их в практику производства пищевых продуктов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kilcast, D. Instrumental Assessment of Food Sensory Quality: A Practical Guide / David Kilcast – UK: Woodhead Publishing. – 2013. <https://doi.org/10.1533/9780857098856.frontmatter>
2. Zhong, J. Evaluation Technologies for Food Quality/ Jian Zhong and Xichang Wang – UK: Woodhead Publishing. – 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.09995-9>
3. Бозина Т.В. Сравнительный анализ различных методов определения йода в пищевых продуктах / Т.В. Бозина, О.Е. Рувинский // Известия вузов. Пищевая технология. – 2003. – № 4. – С. 87-89.
4. Гамаюрова В. С. Пищевая химия: лабораторный практикум / В. С. Гамаюрова, Л. Э. Ржечицкая. СПб.: ГИОРД, 2006.
5. Дамодаран, Ш. Химия пищевых продуктов / Ш. Дамодаран, К. Л. Паркин, О. Р. Феннема (ред.-сост.). – Перев. с англ. – СПб.: Профессия, 2020 г. – 998 с.
6. Донченко, Л. В. Безопасность пищевой продукции. В 2 ч. Часть 1 : учебник для академического бакалавриата / Л. В. Донченко, В. Д. Надыкта. – 3-е изд., испр. и доп. – Москва : Издательство Юрайт, 2019. – 264 с.
7. Донченко, Л. В. Безопасность пищевой продукции. В 2 ч. Часть 2 : учебник для вузов / Л. В. Донченко, В. Д. Надыкта. – 3-е изд., испр. и доп. – Москва : Издательство Юрайт, 2022. – 161 с.
8. Другов Ю. С. Анализ загрязненных биосред и пищевых продуктов / Ю. С. Другов, А. А. Родин. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007.
9. Другов Ю. С. Контроль безопасности продуктов питания и товаров детского ассортимента / Ю. С. Другов, А. А. Родин. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012.
10. Коденцова В.М. Анализ отечественного и международного опыта использования обогащенных витаминами пищевых продуктов / В.М. Коденцова, О.А. Вржесинская // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85, № 2. – С. 31-50.
11. Комин А.О. Современное состояние и перспективы развития сенсорного анализа пищевых продуктов / А.О. Комин, А.Н. Ким, И.И. Бородин // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК-продукты здорового питания. – 2020. – № 4. – С. 43-50.
12. Коренман Я. И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов / Я. И. Коренман, Р. П. Лисицкая. Воронеж : Воронеж. гос. технол. акад., 2002.
13. Корячкина, С.Я. Научные основы производства продуктов питания: учебное пособие для высшего профессионального образования / С.Я. Корячкина, О.М. Пригарина – Орел: ФГБОУ ВПО «Госуниверситет-УНПК», 2011. – 377 с.

14. Лакиза, Н. В. Анализ пищевых продуктов: учебное пособие для вузов / Н. В. Лакиза, Л. К. Неудачина. – Екатеринбург: УрФУ, 2015. – 188 с.
15. Максимова О.А. Анализ методов и технических средств контроля структуры пищевых продуктов / О.А. Максимова, Д.В. Титов, В.В. Митин // Пищевая промышленность. – 2013. – № 10. – С. 20-22.
16. Методические указания к практическим работам по химической технологии. Анализ жиров и растительных масел. / Курамшин А.И., Ильин А.В., Колпакова Е.В., Аксунова А.Ф., Галкин В.И. – Казань: Изд-во Казан. унта, 2016. – 31 с.
17. Панасенко А.И. Определение органических токсических веществ в некоторых пищевых продуктах / А.И. Панасенко, М.С. Дроздова // Вестник ТГУ. – 2009. – Т. 14, вып. 1. – С. 62-63.
18. Пищевая химия / А. П. Нечаев, С. Е. Траубенберг, А. А. Кочеткова и др.; под ред. А. П. Нечаева. СПб.: ГИОРД, 2006.
19. Скурихин И.М. Все о пище с точки зрения химика / И. М. Скурихин, А. П. Нечаев. М.: Высш. шк., 1991. Химический состав пищевых продуктов: в 2 кн. Кн. 2 / по ред. И. М. Скурихина, М. Н. Волгарева. М.: Агропромиздат, 1987.
20. Степанова Г.С. Применение инновационных методов для анализа пищевых продуктов / Г.С. Степанова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. НЭ Баумана. – 2015. – Т. 224, № 4. – С. 226-228.
21. Цыренжапова Н.А. Анализ элементного состава пищевых продуктов, поступающих в дошкольные организации / Н.А. Цыренжапова, И.Ю. Гармаева // Бюллетень ВСНЦ Со РАМН. – 2012. – № 4(86). – С. 206-209.
22. Шленская Т.В. Экспресс-анализ токсичности пищевых продуктов / Т.В. Шленская, В.Н. Голубев // Пищевая промышленность. – 2004. – № 4. – С. 32.
23. Этлеш, С. Методы анализа пищевых продуктов. Определение компонентов и пищевых добавок / С. Этлеш (ред.-сост.). – Перевод с англ. под общ. ред. д.т.н. Ю.Г. Базарновой. – СПб.: Профессия, 2019 г. – 564 с.
24. Юшина Ю.К. Экспресс-методы анализа пищевых продуктов / Ю.К. Юшина, Н.Л. Вострикова, И.А. Становова // Пищевая промышленность. – 2011. – № 4. – С. 32-33.
25. Яшин А.Я. Экспрессный электрохимический метод анализа антиоксидантной активности пищевых продуктов / А.Я. Яшин, Я.И. Яшин, Н.И. Черноусова // Пиво и напитки. – 2004. – № 6. – С. 32-34.

Еремеева Наталья Борисовна

Методы исследования пищевых продуктов

Учебное пособие

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А