

УДК 544.7+543.2

## ПОДХОДЫ К ПРОБОПОДГОТОВКЕ ПИЩЕВЫХ ЭМУЛЬСИЙ ДЛЯ ИХ ЭФФЕКТИВНОГО РАЗРУШЕНИЯ И ОСАЖДЕНИЯ ТРУДНОЛЕТУЧИХ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОНЕНТОВ

© 2021 г. З. Б. Хесина<sup>1</sup>, \*, А. Е. Карнаева<sup>1</sup>, А. К. Буряк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,  
Ленинский проспект, 31, корп. 4, Москва, 117071 Россия

\*e-mail: karnaevajun@gmail.com

Поступила в редакцию 24.09.2021 г.

После доработки 27.09.2021 г.

Принята к публикации 28.09.2021 г.

Газовая хроматография является основным методом анализа летучих веществ в пищевых продуктах, в частности добавок, улучшающих их вкусовые качества и внешний вид. Однако пищевые матрицы обычно представляют собой сложные дисперсные системы (эмульсии, гели, пены), прямой газохроматографический анализ которых затруднен. Кроме того, такие матрицы могут вызвать повреждение хроматографической колонки и загрязнение испарителя и детектора, что приведет не только к получению аналитических данных низкого качества (неприемлемая форма пиков, потери по чувствительности), но и к сокращению срока службы и необходимости частого технического обслуживания всей системы. Поэтому для получения надежных результатов и защиты дорогостоящего аналитического оборудования необходимо использовать методы предварительной обработки образцов с целью их очистки от высококипящих природных соединений. В данной работе мы сравнили два принципиально разных подхода к пробоподготовке пищевых эмульсий – жидкость-жидкостную и твердофазную экстракцию – с целью выбора наиболее приемлемого метода как с точки зрения точности и надежности полученных результатов, так и с позиции экономической целесообразности и временных затрат. Исследование выполнено на примере определения содержания этанола, а также качественного анализа примесных спиртов в спиртовой эмульсии шеллака (E904).

DOI: 10.31857/S0023291221060203

### ВВЕДЕНИЕ

Как природные, так и синтетические добавки находят широкое применение в современной пищевой промышленности. К таким добавкам, в частности, относится шеллак (E904), который является природной смолой, продуктом жизнедеятельности насекомых, обитающих на территории Юго-Восточной Азии и Индии. Он влаго- и светостойчив, плавится при температуре 80°C. В состав шеллака входят алеуретиновая кислота, шелловая кислота, дигидроксифитоцеролловая кислота, вода, краситель и шеллачный воск. Шеллак хорошо растворяется в низших алифатических спиртах, щелочах, но практически нерастворим в жирах, бензине, ацетоне, воде, эфире и маслах. Все это обуславливает активное применение эмульсий шеллака в пищевой промышленности для поверхностной обработки свежих цитрусовых, яблок, груш, дынь, персиков, ананасов и в качестве глазирователя при изготовлении конфет, драже, шоколада, мучных изделий, сухих завтраков, кофе в зернах и жевательной резинки [1].

Газовая хроматография (ГХ) является наиболее распространенным методом анализа летучих компонентов в пищевых продуктах. Однако эмульсии шеллака представляют собой сложные для ГХ-анализа системы. Основные проблемы при их определении связаны со сложностью состава полимерной основы и присутствием множества добавок различной природы, а также с высокой стабильностью эмульсий, что зачастую не позволяет провести качественное разделение и определение компонентов смеси. Основными методиками подготовки эмульсий для ГХ-анализа являются твердофазная экстракция (ТФЭ) и жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) [2]. Парофазный анализ широко применяется в качестве простого и быстрого метода подготовки проб к дальнейшему ГХ-анализу, однако его применение для количественного анализа эмульсий невозможно, так как законы Рауля не выполняются в эмульсиях по причине существенных различий в физических и химических свойствах основных компонентов [3]. ТФЭ – это быстрый, удобный метод экстракции, который используется для извлечения аналитов из жидких и твердых матриц с

применением подходящих сорбентов и растворителей [4]. ТФЭ применяется для анализа летучих компонентов в различных продуктах питания, включая масла [5] и эмульсии [6]. Однако этот метод весьма чувствителен даже к небольшим изменениям экспериментальных условий, таких как температура нагрева, время экстракции, объем, концентрация и однородность образца [7], что не всегда просто проконтролировать в ходе проведения анализа. Кроме того, этот метод пробоподготовки является достаточно дорогим вследствие того, что приспособления, используемые в процессе ТФЭ, чаще всего одноразовые [8]. ЖЖЭ, также известная как экстракция растворителем, представляет собой метод разделения смесей на основе их различной растворимости в двух несмешивающихся жидкостях [9]. Преимуществами этого метода являются его простота, точность, высокая степень извлечения и экономическая целесообразность [10]. Также ЖЖЭ используют для извлечения целевых компонентов с наименьшим количеством соэкстрактивных веществ из тканей или клеток. Используемый в ЖЖЭ экстрагент может выполнять также и функцию деэмульгатора, разрушая эмульсию и осаждая высококипящие природные соединения.

Таким образом, метод ЖЖЭ был выбран в качестве оптимального для пробоподготовки и разрушения пищевых эмульсий перед дальнейшим количественным ГХ-анализом. Целью данного исследования было подобрать растворитель для эффективного извлечения и осаждения полимерной фракции из спиртовой эмульсии шеллака и последующий ГХ-МС-анализ образца для определения этанола и примесных спиртов. Ожидается, что перерастворение определяемых веществ в новом растворителе, в котором полимерная фракция имеет низкую растворимость, позволит провести анализ, не рискуя при этом повредить аналитическое оборудование.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исследуемой смеси был выбран пищевой лак, представляющий собой смесь спиртовой дисперсии шеллака (пищевой добавки E904) с растительным маслом. Для анализа исследуемый образец подготавливали следующим образом: 50 мкл эмульсии пищевого лака добавляли к 1000 мкл растворителя для осаждения полимерной фракции. Растворителями служили вода (Milli-Q), ацетон (о. с. ч., PanReac) и диэтиловый эфир (о. с. ч., PanReac). Далее образец центрифугировали для разрушения эмульсии и полного отделения полимерного осадка, супернатант отбирали, разбавляли растворителем в 80 раз, перемешивали, 1 мкл отбирали и анализировали на газовом хромато-масс-спектрометре SHIMADZU GCMS-TQ8040. Для хроматографического разде-

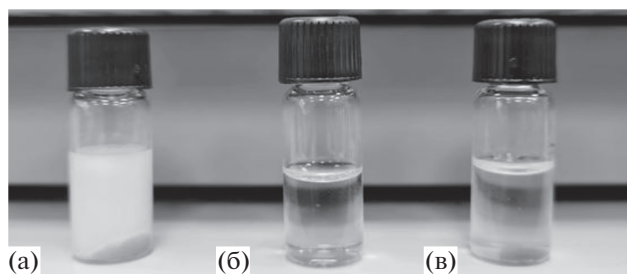
ления использовали полярную капиллярную колонку SH-StabilWax (30 м × 0.25 мм × 0.1 мкм). ГХ-МС-анализ проводили в следующих условиях: начальная температура колонки – 40°C, температура ввода образца – 250°C, режим ввода – с делением потока в отношении 1 : 20, газ-носитель – гелий (скорость потока – 1.01 мл/мин); температурный режим: с 0 по 1 мин выдержка при 40°C, далее нагрев до 150°C со скоростью 10 град/мин и выдержка 1 мин при этой температуре; температура ионного источника – 150°C, регистрация хроматограммы по полному ионному току проводилась в диапазоне значений  $m/z$  от 40 до 600 со скоростью сканирования 0.2 скан/с. Для идентификации примесных спиртов (метанола, пропанола) хроматограмма регистрировалась по выбранным ионам с  $m/z = 32$ ,  $m/z = 60$ , являющимся характеристичными для этих соединений. Время одного цикла составляло 0.03 с. В качестве стандартного образца для количественного анализа использовали этанол (о. с. ч.). Количественный анализ проводился методом добавок. Каждое добавление было выполнено в 3 параллелях. Количество компонента было определено с помощью калибровочного графика ( $R^2 = 0.9998$ ). Относительное стандартное отклонение составляло не более 5%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Подбор растворителя для наиболее эффективного разрушения пищевой эмульсии и осаждения полимерной фракции шеллака*

Ожидается, что перерастворение определяемых спиртов в новом растворителе, в котором растворение труднолетучих полимерных компонентов снижено, приведет к эффективному извлечению и осаждению полимеров, в то время как сами анализируемые соединения перейдут в раствор. В качестве растворителя для перерастворения спиртов и осаждения полимерной основы эмульсии шеллака были опробованы три вещества (вода, ацетон, диэтиловый эфир), в которых шеллак имеет низкую растворимость [11]. При выборе наиболее подходящего растворителя ориентировались на такие параметры, как скорость и полнота осаждения полимерной фракции, а также скорость отстаивания осадка.

На рис. 1 приведены фотографии смесей исследуемой спиртовой эмульсии шеллака с тремя потенциальными осадителями – водой (а), ацетоном (б) и диэтиловым эфиром (в) в соотношении 1 : 10. На рис. 1б видно, что ацетон оказался неподходящим осадителем для полимерной фракции, т.к. выпадения осадка не наблюдалось. Это может быть связано с достаточно высокой растворимостью шеллака в ацетоне или с недостаточной полнотой извлечения полимерной фрак-



**Рис. 1.** Смеси исследуемой спиртовой эмульсии шеллака с тремя потенциальными осадителями в соотношении 1 : 10: водой (а), ацетоном (б) и диэтиловым эфиром (в).

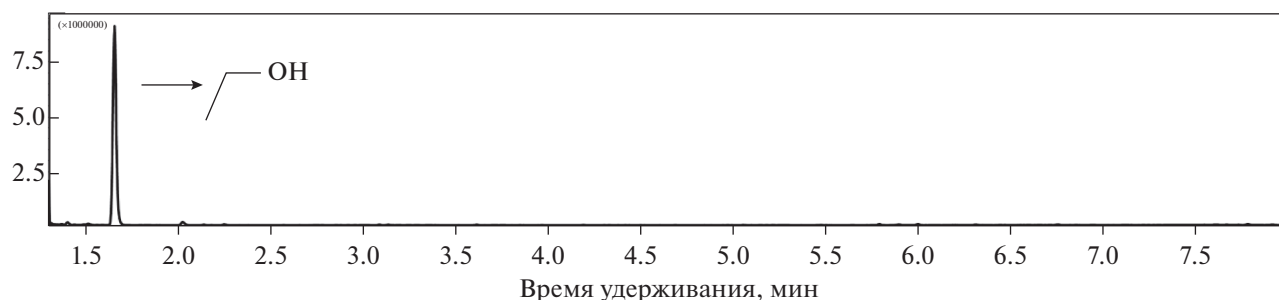
ции ацетоном. Рисунки 1а и 1в демонстрируют, что как вода, так и диэтиловый эфир осаждали полимерную составляющую спиртовой эмульсии шеллака, однако в случае диэтилового эфира (рис. 1в) образующаяся взвесь очень быстро отстаивалась и полимерный осадок выпадал на дно пробирки. При использовании воды (рис. 1а) взвесь была устойчивой и осадок формировался значительно труднее и медленнее. В результате проделанного предварительного эксперимента

диэтиловый эфир был признан наиболее подходящим осадителем для полимерной фракции спиртовой эмульсии шеллака, т.к. при его применении осаждение происходило наиболее быстро и полно. В последующих экспериментах по качественному и количественному анализу спиртов в пробе для осаждения полимерной фракции применялся именно диэтиловый эфир.

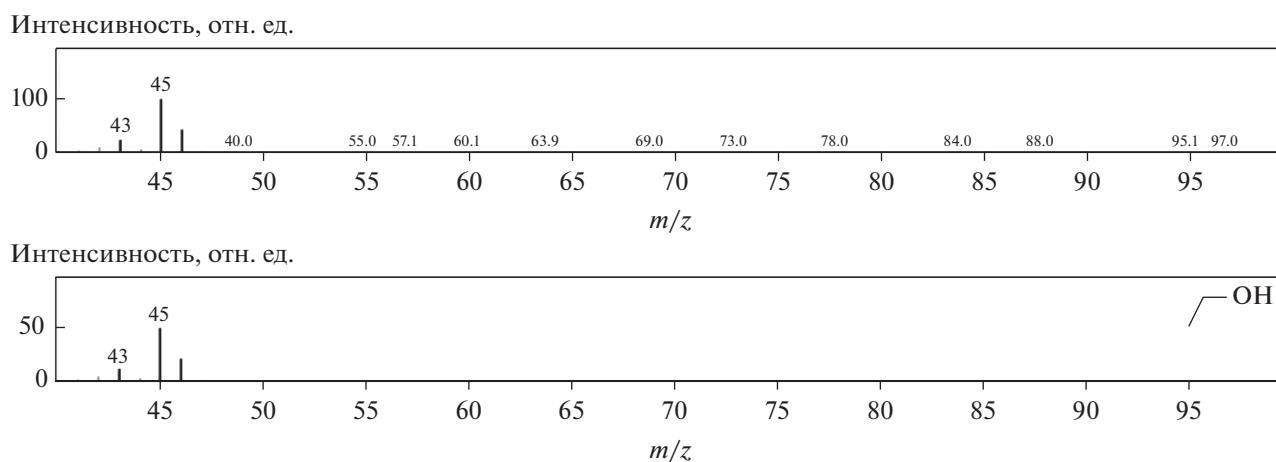
#### *Качественный анализ этанола в спиртовой эмульсии шеллака*

Перед проведением анализа на содержание этанола необходимо было выполнить его качественную идентификацию и определить время хроматографического удерживания. Для этого провели ГХ–МС-анализ по полному ионному току стандартного образца этанола, растворенного в диэтиловом эфире. На рис. 2 представлена полученная хроматограмма по полному ионному току стандартного образца этанола, а на рис. 3 полученный масс-спектр сопоставлен с масс-спектром из библиотеки NIST 2015.

Далее спиртовую эмульсию шеллака подвергли необходимой пробоподготовке и анализировали, как описано в разделе “Материалы и методы”.



**Рис. 2.** Хроматограмма по полному ионному току стандартного образца этанола.



**Рис. 3.** Сравнение масс-спектра стандартного образца этанола (а) с библиотечным масс-спектром (б).

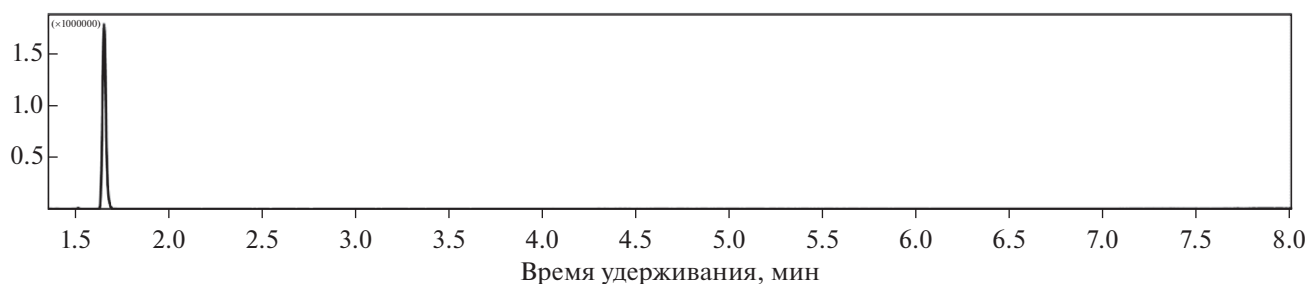


Рис. 4. Хроматограмма по выделенному иону этанола ( $m/z = 45$ ) эфирного экстракта пробы эмульсии пищевого лака.

На рис. 4 приведена хроматограмма по выделенному иону этанола ( $m/z = 45$ ) для эфирного экстракта анализируемой пробы. Время удерживания определяемого вещества этанола совпадало с временем удерживания стандартного образца этанола.

Для анализа примесных спиртов проводили детектирование в режиме регистрации выбранных ионов (SIM-мониторинг выбранных ионов с  $m/z = 32$  для метанола и  $m/z = 60$  для пропанола). Метанол был обнаружен в пробе в следовом количестве, пропанол обнаружен не был.

#### Количественный анализ этанола в пробе

Количественный анализ этанола проводили с помощью построения градуировочной зависимости площадей хроматографических пиков от концентраций. Для приготовления калибровочных образцов к 50 мкл исследуемой эмульсии добавляли различные объемы (от 1 до 50 мкл) чистого этанола (метод добавок), а затем такой объем диэтилового эфира, чтобы суммарный объем пробы всегда составлял 1050 мкл. Далее проводили пробоподготовку полученных эфирных растворов, как это описано в разделе “Материалы и методы”. С помощью полученной градуировочной зависимости нашли концентрацию этанола в образце эмульсии пищевого лака, которая составила  $770 \pm 40$  мг/г или  $77 \pm 5\%$  по массе.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения исследования показано, что подход к пробоподготовке спиртовой эмульсии шеллака с применением ЖЖЭ является оптимальным. Важным этапом при разработке методики ЖЖЭ был выбор подходящего растворителя, который должен отвечать следующим требованиям: растворять анализируемые спирты и при этом эффективно, быстро и полно осаждать труднорастуемые полимерные компоненты эмульсии. Эти требования были достигнуты при применении диэтилового эфира в качестве экстрагента.

Последующий ГХ-анализ позволил идентифицировать и количественно определить анализируемые спирты без риска повредить дорогостоящее аналитическое оборудование. Такой подход может быть использован при анализе биологических объектов, склонных к образованию эмульсий при пробоподготовке, в частности, при экстракции целевых компонентов или лекарственных препаратов из клеток.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-983.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yuan Y., He N., Xue Q., Guo Q., Dong L., Haruna M.H., Li L. // Trends Food Sci. Technol. 2021.
2. Russo M.V., Avino P., Perugini L., Notardonato I. // RSC Adv. 2015. V. 5. P. 37023.
3. Lee L.S., Hagwall M., Delfino J.J., Rao P.S.C. // Environ. Sci. Technol. 1992. V. 26. P. 2104.
4. Tian H., Yang X., Ho C.T., Huang Q., Song S. // Food Chem. 2013. V. 141. P. 131.
5. Jiménez A., Beltrán G., Aguilera M.P. // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1028. P. 321.
6. Beltran G., Aguilera M.P., Gordon M.H. // Food Chem. 2005. V. 92. P. 401.
7. Khesina Z.B., Iartsev S.D., Revelsky A.I., Buryak A.K. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2021. V. 195. 113843.
8. Yang X., Peppard T. // J. Agric. Food Chem. 1994. V. 42. P. 1925.
9. Wu J., Lu J., Wilson C., Lin Y., Lu H. // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. P. 6327.
10. Yanase N., Naganaw, H., Nagano T., Noro J. // Anal. Sci. 2011. V. 27. P. 171.
11. Phaechamud T., Praphanwittaya P., Laotaweesub K. // J. Pharm. Investig. 2018. V. 48. P. 409.