



УДК 543.8:66.081.3

Сорбция микропримесей легколетучих органических соединений белковыми матрицами

Асанова Ю.А., Кучменко Т.А.

Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж

Аннотация

Установлены некоторые особенности распределения спиртов, альдегидов, кетонов, карбоновых кислот, ароматформирующих добавок между белковой матрицей и равновесной газовой фазой. Изучена сорбция легколетучих компонентов нативных белковых систем на пленках модификаторов электродов пьезокварцевых резонаторов. Разработан способ анализа белковых матриц с низким содержанием влаги по аромату с применением массива разнородных пьезосенсоров

Ключевые слова: сорбция, газовый анализ, органические соединения, белки, пьезосенсоры

Few particularity of spread alcohols, aldehydes, ketones, carbonic acids, aromatic additions between protein matrix and gaseous phase in equilibrium were found out. Sorption easy volatile components of natural protein systems on films transformations electrodes piezoquartz resonators were studied. The way of analyze of protein matrix with low concentration water depending of smell in application array different piezoquartz sensors were suggested.

Введение

В качестве измерительных элементов при изучении сорбции низких концентраций веществ на тонких пленках разной природы применяют пьезовесы, которые являются высокочувствительными детекторами легколетучих веществ в газовой фазе [1]. Селективность и чувствительность пьезовесов регулируют тонкопленочными сорбентами. Применение нескольких пьезокварцевых резонаторов с различными по природе пленочными покрытиями на электродах позволяет значительно сократить временные затраты, существенно увеличить информативность эксперимента, что немаловажно при изучении сорбции многокомпонентных смесей. Среди рутинных лабораторных исследований особое место занимает анализ пищевых продуктов. Особенности пищевого анализа связаны с отсутствием первичных стандартов, изменениями свойств продуктов в процессе их хранения (наиболее существенно – органолептических свойств), что приводит к появлению новых легколетучих компонентов в равновесной газовой фазе (РГФ); индивидуальностью и сложностью состава готовых продуктов и сырья; отсутствием быстрых, надежных способов и средств анализа, в том числе пригодных для измерений в режиме «at-line», без многостадийной пробоподготовки. Задача анализа

усложняется постоянно обновляющимся ассортиментом ароматформирующих добавок натурального и искусственного происхождения, широко применяемых при производстве.

Аромат продукта (качественный и количественный состав его равновесной или неравновесной газовой фазы) является основным носителем информации о качественном составе пробы.

Цель исследования – установление особенностей распределения легколетучих компонентов творожных белковых продуктов без добавок и с добавлением ароматформирующих веществ различной природы между пищевой матрицей и газовой фазой с применением массива пьезомикровесов с регулируемой чувствительностью.

Эксперимент

Изучена сорбция летучих соединений (карбоновых кислот, спиртов, альдегидов, кетонов) в статических условиях на пленках сорбентов – модификаторов электродов пьезокварцевого резонатора (ПКР) АТ-среза с базовой частотой колебаний 8–10 МГц (диаметр электродов = 4 мм) (ООО «Пьезо», Москва) с применением газоанализатора «МАГ-8» (ООО «СенТех», Воронеж). Частотный сигнал кварцевого резонатора регистрировали устройством на основе микропроцессора и обрабатывали с применением специального программного обеспечения «Электронный нос» (язык программирования - Turbo Pascal, на платформе NET 2.0 и базы данных MS SQL Server или MS SQL Express, ООО «Квадро Софт»).

Электроды ПКР модифицировали равномерным нанесением растворов сорбентов (концентрация 5–10 мг/см³) с последующим статическим испарением свободных растворителей в сушильном шкафу таким образом, чтобы масса пленочного покрытия после сушки составила 10–15 мкг. Полноту удаления растворителя контролировали по постоянству частоты колебания пьезосенсора $F_{пл}$, Гц. В качестве растворителей сорбентов применяли этиловый спирт, ацетон, хлороформ, толуол классификации ч. д. а.

Модификаторы электродов ПКР (сорбенты) выбирали по критерию чувствительности и избирательности на основе сформированного банка данных (методы пьезокварцевого микровзвешивания, экстракционного концентрирования, газовой хроматографии) [1]. В качестве модификаторов электродов изучены стандартные хроматографические фазы, различающиеся полярностью, а также специфические сорбенты: полиэтиленгликоль ПЭГ-2000 (ПЭГ-2000), полиэтиленгликольадипинат (ПЭГА), полиэтиленгликольсебацинат (ПЭГСб), полиэтиленгликольсукцинат (ПЭГСк), полиэтиленгликольфталат (ПЭГФ), поливинилпирролидон (ПВП), триоктилфосфиноксид (ТОФО), Тритон X-100 (ТХ-100), 4-аминоантипирин (4-ААП), полистирол (ПС), пчелиный воск (ПчВ), дициклогексан-18-краун-6 (ДЦГ-18-К-6).

В качестве объектов исследования для тренинга массива пьезосенсоров выбраны модельные пробы, а также творожные сырки с добавками.

Образцы помещали в герметичные бюксы с полиуретановой мембраной на крышке, термостатировали и отбирали газовым шприцем РГФ. Пробу РГФ вводили в ячейку детектирования статического «электронного носа» «МАГ-8» со скоростью 1 см³/с и фиксировали частоту колебаний каждого пьезосенсора в массиве. Аналитическим сигналом пьезосенсора (ΔF , Гц) является изменение частоты

колебаний кварцевой пластины вследствие сорбции легколетучих компонентов из газовой фазы на пленке сорбента.

Все измерения проводили в идентичных условиях при температуре детектирования 20 ± 1 °С. Ячейку детектирования и пьезосенсоры регенерировали продувкой осушенным лабораторным воздухом в течение 10 мин. Метрологическую обработку данных проводили по стандартной методике [2] с применением компьютерной программы.

Сорбционную емкость (а) пленок рассчитывали как отношение аналитического сигнала сенсора в парах тест-вещества (ΔF , Гц) к аналитическому сигналу резонатора при нанесении пленки ($\Delta F_{пл}$, Гц):

$$a = \frac{\Delta F}{\Delta F_{пл}} \quad (1)$$

Степень сорбции ζ (%) рассчитывали по формуле

$$\zeta = \frac{\Delta F_{max} \Delta F_{\tau}}{\Delta F_{max}} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где ΔF_{max} – максимальный аналитический сигнал сенсора (Гц); ΔF_{τ} , Гц – аналитический сигнал сенсора в некоторый временной срез (Гц).

В качестве критериев сорбционной активности пленок модификаторов к легколетучим компонентам выбраны сорбционная емкость, кинетические параметры сорбции (время установления равновесия, время достижения максимального отклика сенсора).

Для проверки достоверности полученных результатов параллельно модельные растворы белков с ароматформирующими добавками исследовали методом ВЭЖХ на хроматографе «Цвет Яуза» (НПО «Химавтоматика», Москва) в Центре стратегического развития научных исследований Воронежской государственной технологической академии.

Обсуждение результатов

Химический состав творожных сырков весьма сложен, представлен веществами различных классов и полярности (карбоновые кислоты, спирты, альдегиды, эфиры, кетоны, стеринны и др.) [3], поэтому рекомендовать селективный сорбент-модификатор для определения микропримесей в РГФ творожных продуктов невозможно. Для анализа РГФ многокомпонентных матриц применяют массив сенсоров с перекрестной чувствительностью к основным легколетучим веществам газовой фазы продуктов.

По результатам предварительного эксперимента с учетом стабильности 12 пленок, величины отклика в РГФ образцов, мешающего влияния влаги, селективности к искусственным и натуральным добавкам для оценки влияния ароматформирующих веществ в белковых матрицах выбран оптимальный массив сенсоров с пленками ПВП, ПЭГА, ТХ-100, ДЦГ-18-К-6, ТОФО. Выбранное число сенсоров является минимальным и достаточным для надежной идентификации в анализируемых системах изменений в составе РГФ и при необходимости искусственных ароматизаторов.

Для выбранных пленок оценены воспроизводимость откликов сенсора при многократной эксплуатации, сорбционная емкость пленочных покрытий, степень сорбции легколетучих компонентов классического творога без добавок и 0,03 об. %

водных растворов уксусной кислоты и ацетальдегида, что соответствует их количественному содержанию в натуральной белковой матрице (молоко, творог), установленному методом газовой хроматографии [4] (табл. 1).

Таблица 1. Основные характеристики сорбции летучих компонентов классического творога без добавок и водных растворов уксусной кислоты и ацетальдегида ($\omega = 0,03$ об. %) на выбранных пленках сорбентов

Наименование пленки	Водный раствор уксусной кислоты			Водный раствор ацетальдегида			Классический творог		
	$a \cdot 10^2$	ζ^* , %	Δ , %	$a \cdot 10^2$	ζ^* , %	Δ , %	$a \cdot 10^2$	ζ^* , %	Δ , %
ПВП	398	26	9,26	375	24	8,67	205	14	6,14
ПЭГА	282	38	7,84	205	33	7,48	103	30	8,21
ТХ-100	317	24	9,03	258	18	7,95	154	15	7,46
ДЦГ-18-К-6	308	32	8,15	223	27	6,88	139	25	6,16
ТОФО	213	27	7,41	187	23	9,14	82	22	6,04

* - Степень сорбции, рассчитанная для 20 с сорбции (время достижения максимального аналитического сигнала).

Установлено, что выбранные пленки проявляют относительно невысокую сорбционную активность к парам уксусной кислоты и ацетальдегида. К тому же степень сорбции, рассчитанная по двум временным срезам: 20 с (момент наступления максимальной сорбции на всех пленках) и 60 с (окончание фиксирования аналитического сигнала), не превышает 40 %, что подтверждает отсутствие высокоселективного сорбционного взаимодействия сорбируемых веществ с изучаемыми модификаторами. Аналитический сигнал сенсоров с пленкой ПЭГА, проявляющего высокую избирательность к карбоновым кислотам, в парах водного раствора уксусной кислоты значительно выше, чем в РФФ над белковой матрицей. Следовательно, легколетучие компоненты классического творога, в частности, уксусная кислота, удерживаются белковой матрицей, а именно, липофильными поверхностно-активными веществами, и их содержание в РФФ значительно занижено.

Если липидами удерживаются нативные компоненты белковой матрицы, то априори предположим значительное удерживание искусственно введенных ароматформирующих добавок различной природы.

Рассмотрим особенности сорбции РФФ классического творога без добавок и с добавлением искусственного ароматизатора «Ванилин» ($\omega_{\text{добавки}} = 0,05$ мас. %), как наиболее распространенной ароматформирующей добавки в пищевой и непивной промышленности, на тонких пленках модификаторов ТХ-100 и ПВП по сигналам сенсоров в различных временных срезах (табл. 2).

Таблица 2. Сигналы сенсоров с пленками ПВП и ТХ-100 в выбранных временных срезах сорбции

Наименование пленки	Классический творог без добавок			Классический творог с добавлением искусственного ароматизатора «Ванилин»		
	5 с	20 с	60 с	5 с	20 с	60 с
ПВП	24 ± 3	23 ± 2	20 ± 1	43 ± 4	40 ± 3	36 ± 3
ТХ-100	21 ± 1	22 ± 2	18 ± 1	24 ± 1	27 ± 2	33 ± 3

Установлено, что на тонкой пленке ТХ-100 для легколетучих компонентов классического творога без добавок максимальный аналитический сигнал достигается за 20 с, затем наблюдается самопроизвольная десорбция веществ. При добавлении искусственной добавки в матрицу творога максимальный аналитический сигнал сенсора не достигается даже на 60 с сорбции, т. е. наблюдается накопительная сорбция, что характерно для сорбции веществ синтетического происхождения. Кинетика сорбции паров классического творога без добавок и с добавлением искусственного ароматизатора на тонкой пленке ПВП идентична, хотя введение ароматформирующей добавки в матрицу творога способствует увеличению аналитического сигнала почти вдвое. Следовательно, по характеру сорбции и величине аналитического сигнала сенсоров с выбранными пленками возможно детектирование незначительных примесей в РГФ образцов сложного состава и в частности, установление факта присутствия ароматизатора искусственного происхождения в пищевых продуктах.

В идентичных условиях получены кинетические «визуальные отпечатки» РГФ классического творога без добавок и с добавлением 0,05 мас. % искусственного ароматизатора «Ванилин», 0,05 мас. % натуральной ванили и смеси искусственного ароматизатора «Ванилин» ($\omega = 0,05$ мас. %) с натуральной ванилью ($\omega = 0,05$ мас. %) (рис. 1).

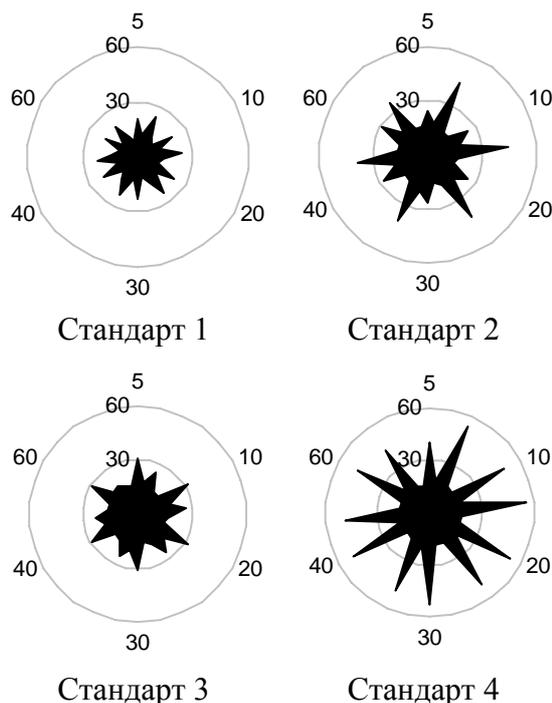


Рис. 1. Кинетические «визуальные отпечатки» РГФ проб-стандартов: стандарт 1 – классический творог без добавок; стандарт 2 – классический творог с добавлением искусственного ароматизатора «Ванилин»; стандарт 3 – классический творог с добавлением натуральной ванили; стандарт 4 - классический творог с добавлением искусственного ароматизатора «Ванилин» и натуральной ванили

Кинетический «визуальный отпечаток» является примером визуализации суммарного многомерного сигнала массива сенсоров при одновременном их экспонировании в парах классического творога без добавок и с добавками [1]. Качественной характеристикой пробы является геометрия кинетического

«визуального отпечатка» ее аромата, а количественной – площадь «визуального отпечатка». Форма геометрии кинетического «визуального отпечатка» РГФ классического творога без добавок объясняется отсутствием высокоселективного сорбционного взаимодействия летучих компонентов с выбранными пленками-модификаторами. «Визуальный отпечаток» РГФ классического творога принят в качестве исходного (естественного) фона матрицы анализируемых творожных сырков и как нулевой сигнал массива сенсоров. При добавлении искусственного ароматизатора «Ванилин» в матрицу творога в геометрии «визуального отпечатка» появляются ярко выраженные пики, свидетельствующие о присутствии синтетического усилителя запаха в РГФ пробы. При внесении натуральной добавки в матрицу творога геометрия «визуального отпечатка» практически не меняется, но увеличивается суммарный аналитический сигнал. Это объясняется тем, что натуральные добавки содержат легколетучие молекулы, по химическому составу сходные с молекулами РГФ классического творога (альдегиды, кислоты, кетоны и др.). В результате увеличивается только концентрация летучих компонентов газовой фазы, но качественные изменения состава не существенны, либо выбранного числа сенсоров не достаточно для детектирования их в РГФ.

Геометрия «визуального отпечатка» РГФ модельной смеси классического творога с искусственным ароматизатором и натуральным ароматформирующим ингредиентом включает в себя характерные особенности двух отличных по генезису усилителей запаха.

Для оценки количественного влияния искусственной добавки на интенсивность аромата построена зависимость площади «визуальных отпечатков» (S , ед²) от содержания ароматизатора в водном растворе и творожном продукте (рис. 2).

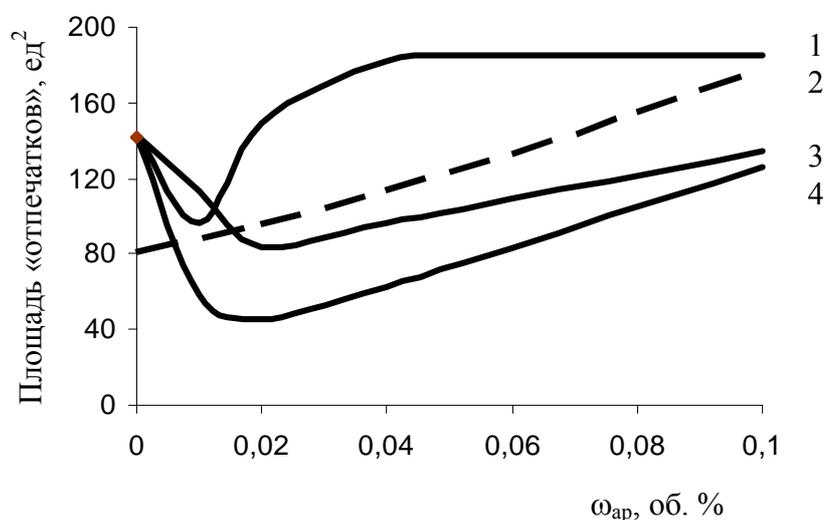


Рис. 2. Зависимость площади кинетических «визуальных отпечатков» от массовой доли ароматизатора в водном растворе (2) и творожном продукте с добавлением ароматизатора «Смородина» (1), «Малина» (3), «Ананас» (4).

Установлено, что функция $S = f(\omega_{ар}, \% \text{ об.})$ для модельной смеси творога с ароматизаторами имеет параболический характер с положением точки минимума при содержании ароматизатора 0,02 % об. При меньшем содержании добавки площадь «визуальных отпечатков» уменьшается по сравнению с исходным стандартом (классический творог без добавок). Это подтверждает предположение о

связывании ароматформирующих молекул добавки матрицей творога («мертвый» объем ароматизатора) и удерживанием естественных легколетучих соединений белкового продукта. При дальнейшем увеличении концентрации ароматизатора интенсивность запаха пропорционально возрастает. Для водного раствора ароматизатора не характерны подобные закономерности, площадь «визуальных отпечатков» прямо пропорционально возрастает с увеличением концентрации ароматизатора.

В идентичных условиях получены хроматограммы экстракта основных компонентов из классического творога без добавок и с добавлением искусственного ароматизатора «Ванилин» (0,03 об. %). В качестве экстрагента применяли бидистиллированную воду (рис. 3).

Идентификацию компонентов классического творога проводили методом внутреннего стандарта (рис. 3 б). Установлено, что в условиях хроматографирования в экстракте творога уксусная, масляная, капроновая, лауриновая кислоты не полностью разделяются на хроматографической колонке, но присутствуют в пробе. При внесении в белковую матрицу искусственного ароматизатора «Ванилин» на хроматограмме появляются новые пики, соответствующие орто-ванилину и этилванилину (рис. 3 в).

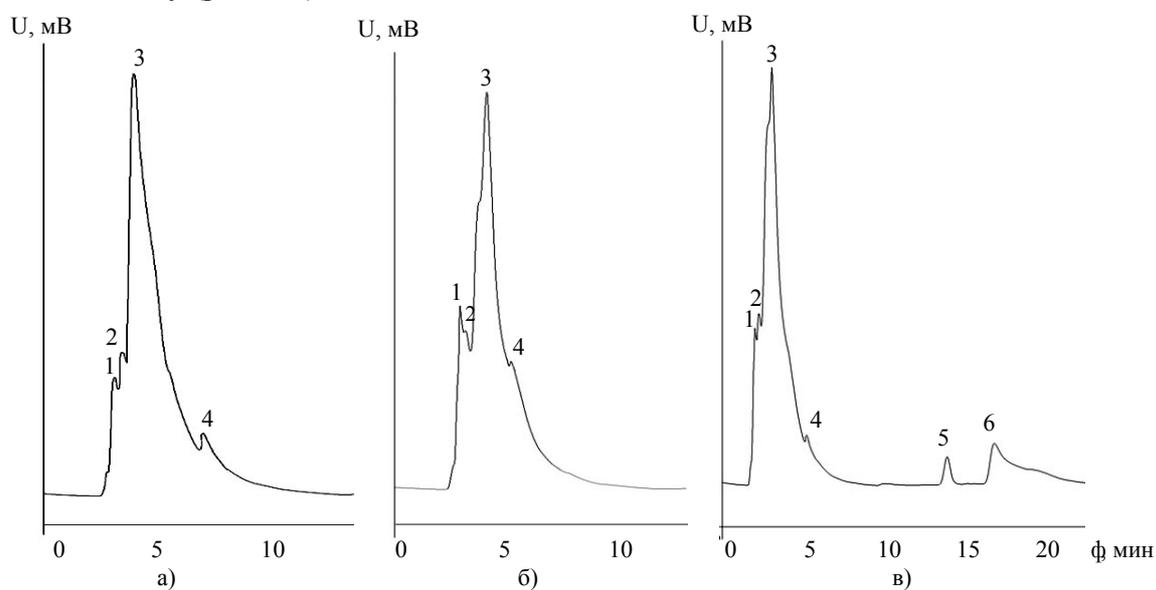


Рис. 3. Хроматограммы водных растворов белковой матрицы (а), белковой матрицы с введением внутреннего стандарта (б), белковой матрицы с добавлением искусственного ароматизатора «Ванилин» (в): 1 – уксусная кислота; 2 – масляная кислота; 3 – капроновая кислота; 4 – лауриновая кислота; 5 – орто-ванилин; 6 – этилванилин

Таким образом, результаты, полученные хроматографическим методом и пьезокварцевым микровзвешиванием, коррелируют между собой. Следовательно, с применением массива пьезосенсоров возможно установление изменений в составе РФГ классического творога при добавлении ароматформирующих веществ.

Продемонстрируем возможность применения массива сенсоров для идентификации искусственных ароматизаторов в пробах творожных сырков с добавлением ванили. Для этого в идентичных условиях получены кинетические «визуальные отпечатки» РФГ проб-стандартов и исследуемых образцов (рис. 4).

Сопоставляя геометрические характеристики кинетических «визуальных отпечатков» РГФ творожных сырков и проб-стандартов, можно судить о фальсификации готовой продукции путем добавления искусственных ароматизаторов. Так, пробы 1, 2 фальсифицированы добавлением искусственного ароматизатора «Ванилин», о чем свидетельствует идентичность кинетических «визуальных отпечатков» РГФ этих творожных сырков и стандарта 1. Для этих проб характерны идентичные кинетические «визуальные отпечатки» (степень соответствия > 95 %). Это косвенно подтверждает применение единой технологии изготовления творожных сырков с добавлением ванили, качество и природу применяемых добавок. Тестируемая продукция принадлежит одному производителю, что объясняет аналогичную технологию изготовления, идентичность состава готового продукта и применяемого сырья, хотя по внешнему виду пробы отличаются формой, упаковкой, товарным знаком и стоимостью.

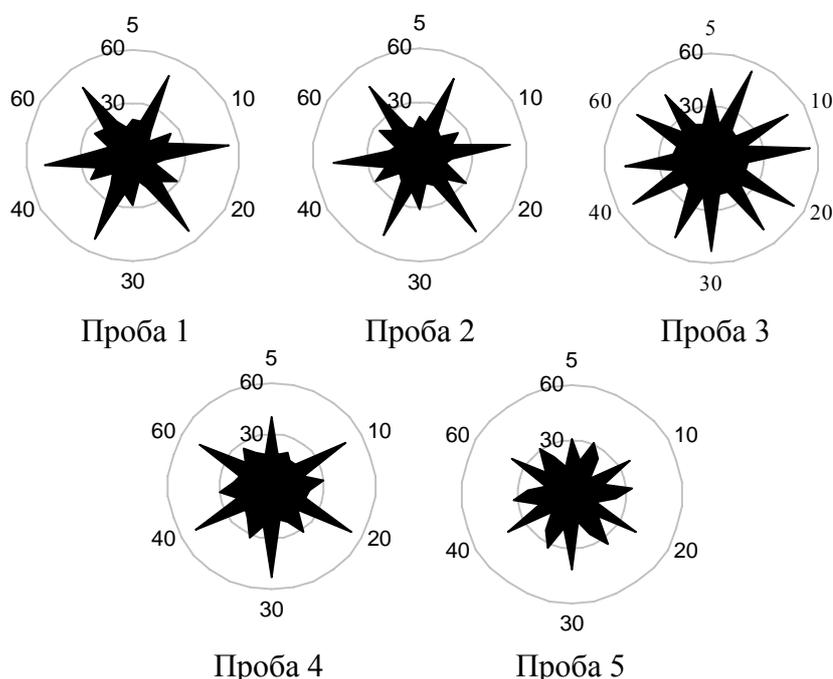


Рис. 4. Кинетические «визуальные отпечатки» РГФ творожных сырков различных производителей с ванилью (пробы 1-5)

Установлено, что пробы 3, 5 содержат смесь искусственных и натуральных ароматических веществ, поскольку соответствуют стандарту 3. Однако, содержание усилителей запаха в пробе 5 значительно ниже, чем в пробах 3, что свидетельствует о корректном соблюдении рецептуры при добавлении ароматических веществ.

Из всех протестированных проб творожных сырков только проба 4 содержит в качестве добавки натуральную ваниль (соответствует стандарту 2). Искусственных усилителей запаха в этой пробе не обнаружено. Выводы подтверждены результатами анализа экстрактов методом ВЭЖХ.

Результаты анализа обобщены в табл 3.

Таким образом, установлено, что нативные легколетучие вещества удерживаются в белковой матрице липофильными поверхностно-активными веществами, а искусственно внесенные синтетические ароматизаторы концентрируются в газовой фазе, формируя аромат продукта.

Таблица 3. Результаты тестирования творожных сырков на присутствие в них искусственных ароматизаторов

№ пробы	Соответствие стандартам	Выводы
1	Стандарт 1	Фальсифицирована
2	Стандарт 1	Фальсифицирована
3	Стандарт 3	Применен ароматизатор идентичный натуральному
4	Стандарт 2	Хорошего качества
5	Стандарт 3	Применен ароматизатор идентичный натуральному

Список литературы

1. Кучменко Т. А. Применение метода пьезокварцевого микровзвешивания в аналитической химии. Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. технол. акад. 2001. 280 с.
2. Систематические и случайные погрешности химического анализа: Учебное пособие для вузов / Под ред. М. С. Черновьянца. М.: ИКЦ «Академкнига». 2004. 157 с.
3. Крусъ Г. Н., Шалыгина А. М., Волокитина З. В. Методы исследования молока и молочных продуктов. М.: Колос. 2002. 368 с.
4. Тепел А. Химия и физика молока / Пер. с нем. Л. Ф. Теречек. М.: Пищ. пром-сть. 1979. 623 с.