



Методика контроля содержания свободной глутаминовой кислоты в пищевой продукции

Е. И. Полянских¹✉, Т. А. Федорова¹, Л. Л. Бelyшева¹, Н. В. Цемборевич¹

¹Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», Минск, Республика Беларусь, e-mail: alena.ip@mail.ru

Поступила в редакцию 27.06.2022 г.; после доработки: 23.09.2022 г.; принята в печать: 27.09.2022 г.

Аннотация – Разработана и валидирована методика определения свободной, не связанной в белке глутаминовой кислоты (ГК) в различных группах пищевой продукции. Методика характеризуется простотой, надежностью, высокой чувствительностью, прошла метрологическую аттестацию и может быть применима в аккредитованных лабораториях РБ. Процедура основана на экстракции свободной, не связанной в белке ГК из пищевой продукции раствором соляной кислоты концентрацией 0,02 моль/дм³, центрифугировании, проведении реакции дериватизации ГК и количественном определении дериватизата методом высокoeffективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектированием. Хроматографическое определение ГК осуществлялось на обращенно-фазной колонке C18 (Eclips Plus C18, 100 мм x 4,6 мм, 3,5 мкм) в режиме градиентного элюирования. Использовали подвижную фазу состава: А – фосфатно-боратный буферный раствор с рН 8,2, В – метанол : ацетонитрил : дистиллированная вода (45:45:10 об.%). Диапазон количественного определения ГК составил 0,25 – 100 г/кг. Максимальная расширенная неопределенность полученных результатов не превысила 26,3%.

Ключевые слова: глутаминовая кислота, ВЭЖХ, определение, экстракция, дериватизация, пищевая продукция.

Chemical safety of food products

Control Procedure For Free Glutamic acid Content In Food Products

Alena I. Palianskikh¹✉, Tatsiana A. Fiodarava¹, Ludmila L. Belyshava¹, and Natalia V. Tsemborevitch¹

¹Republican Unitary Enterprise “Scientific Practical Center of Hygiene”, Minsk, Republic of Belarus, e-mail: alena.ip@mail.ru

Received June 27, 2022; Revised: September 23, 2022; Accepted: September 27, 2022

Abstract – A method for the determination of free, non-protein-bound glutamic acid (GA) in various groups of food products has been developed. The technique is characterized by simplicity,

reliability, high sensitivity and can be applicable in accredited laboratories. The procedure is based on the extraction of free, non-protein-bound GA from food products with a solution of hydrochloric acid with a concentration of 0.02 mol/dm^3 , centrifugation, GA derivatization reaction and quantitative determination of its derivatizate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Chromatographic determination of GA was carried out on a reverse-phase C18 column (Eclips Plus C18, 100 mm x 4.6 mm, $3.5 \mu\text{m}$) in the gradient elution mode. The mobile phase of the composition was used: A – phosphate-borate buffer solution with $\text{pH}=8.2$, B – methanol:acetonitrile:distilled water (45:45:10 vol%). The range of quantitative determination of GA was 250-100000 mg/kg. The maximum expanded uncertainty of the obtained results did not exceed 26.3%.

Keywords: glutamic acid, HPLC, determination procedure, extraction, derivatization, food products

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в пищевой промышленности широко применяются усилители вкуса и аромата. Данные пищевые добавки призваны влиять на вкусовые рецепторы человека. Многие из них не только усиливают вкус продукта, но и влияют на его запах. Усилители вкуса и аромата применяют при производстве мясо- и рыбопродуктов, продуктов переработки овощей, грибов, соусов, кетчупов, продуктов быстрого приготовления, бульонных кубиков, вкусо-ароматических смесей для обсыпки чипсов, орехов, кондитерских изделий. Одним из самых распространённых усилителей вкуса и аромата, применяемых в пищевой промышленности, является глутаминовая кислота (ГК) (Е 620) и ее соли (Е 621-Е 625). Однако чрезмерное потребление продукции с данными добавками может негативно сказаться на здоровье человека, вызвать головную боль, повысить артериальное давление и уровень инсулина [1].

Содержание ГК и ее солей в пищевой продукции регулируется требованиями технического регламента Евразийского экономического союза ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» [2], который устанавливает предельное содержание добавок Е 620–Е 625 в пищевых продуктах на уровне 10 г/кг (в пересчете на глутаминовую кислоту).

Все выше изложенное обуславливает необходимость проведения контроля содержания свободной ГК в пищевой продукции, произведенной не только на территории Республики Беларусь, а также государств-членов ЕАЭС. Высокоэффективная жидкостная хроматография является одним из основных методов исследования, применяемым при анализе ГК в пищевой продукции [3–8], и лежит в основе ряда аттестованных методик. Однако методики, действующие на территории государств-членов ЕАЭС, обычно включают в себя исследование содержания общей ГК (связанной в белке и свободной). Кроме того, имеющиеся методики по определению свободной ГК не охватывают весь спектр производимой пищевой продукции [4, 6-7]. В связи с этим целью данной работы явилась разработка методики, позволяющей быстро, с высокой надежностью и достоверностью определять свободную ГК во всех видах пищевой продукции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы, материалы, оборудование

В качестве стандартного образца использовали L-(+)-глутаминовую кислоту ($\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich).

Использовали ацетонитрил для ВЭЖХ (Fisher Chemical), метанол для ВЭЖХ (Acros Organics), кислоту соляную (х.ч), натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный (х.ч.), тетраборат натрия (х.ч), азид натрия (х.ч), кислоту борную (х.ч), натрия гидроокись (х.ч), 3-меркаптопропионовую кислоту ($\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich), ортофталевый альдегид (Glentham Life Sciences). Условия хроматографирования оптимизировали на колонке Eclipse Plus C18 длиной 100 мм, внутренним диаметром 4,6 мм и с зернением сорбента 3,5 мкм (Agilent Technologies, Германия). Использовали ультразвуковую баню Sonorex super RK 103H (Bandbelin, Германия), центрифугу охлаждаемую 3-18K (Sigma, Германия), иономер (рН-метр) с диапазоном измерения от 0,00 до 14,00 (Thermo, Польша). Количественное определение ГК проводили с помощью жидкостного хроматографа, оснащенного диодно-матричным и флуоресцентным детекторами Agilent 1260 (Agilent Technologies, США-Германия).

Приготовление градуировочных растворов

Градуировочные растворы ГК массовыми концентрациями 15,0; 30,0; 45,0; 60,0 мкг/см³ готовили из основного стандартного раствора ГК концентрацией 1,0 мг/см³, полученного в результате растворения навески ГК в растворе соляной кислоты концентрацией 0,1 моль/дм³.

Градуировочный раствор ГК массовой концентрацией 5,0 мкг/см³ готовили из стандартного раствора ГК концентрацией 100 мкг/см³, полученный путем разбавления основного стандартного раствора ГК концентрацией 1,0 мг/см³.

Приготовление боратного буферного раствора

В стакан вместимостью 250 см³ помещали 100 см³ 2% раствора борной кислоты и приблизительно 60 см³ 2% раствора гидроксида натрия, устанавливали рН=10,2 при помощи 2% раствора гидроксида натрия.

Приготовление раствора дериватизирующего реагента

В центрифужную пробирку вместимостью 50 см³ помещали ($0,200 \pm 0,003$) г орто-фталевого альдегида, добавляли 20 см³ боратного буферного раствора и 0,2 см³ 3-меркаптопропионовой кислоты, затем помещали пробирку на электровстряхиватель на 60 мин.

Приготовление дериватизированных градуировочных растворов ГК

В мерную колбу вместимостью 10 см³ помещали 1 см³ боратного буферного раствора с рН10,2, 0,5 см³ градуировочного раствора ГК, 0,3 см³ раствора дериватизирующего реагента, содержимое перемешивали. Затем в колбу приливали 1 см³ раствора HCl молярной концентрации 0,1 моль/дм³, доводили объем дистиллированной водой до метки на колбе и перемешивали.

Условия хроматографирования

Идентификацию ГК проводили по времени удерживания при длине волны экстинкции 340 нм и длине волны эмиссии 450 нм.

Условия градиентного элюирования ГК представлены в таблице 1.

Подвижная фаза А: фосфатно-боратный буферный раствор с рН8,2: 0,14% раствор натрия фосфорнокислого двузамещенного и 0,38% раствор натрия тетраборнокислого.

Подвижная фаза Б: метанол : ацетонитрил : вода (45:45:10 об.%).

Таблица 1. Условия градиентного элюирования глутаминовой кислоты, скорость подачи подвижной фазы (ПФ) – 0,8 мл/мин

Table 1. Gradient elution conditions for glutamic acid, mobile phase feed rate (MP) – 0.8 ml/min

Время анализа, мин	Состав подвижной фазы, об. %	
	Подвижная фаза А	Подвижная фаза Б
0	98	2
0,5	98	2
13,0	40	60
14,0	0	100
15,0	98	2
20,0	98	2

Хроматограмма стандартного раствора ГК представлена на рисунке 1.

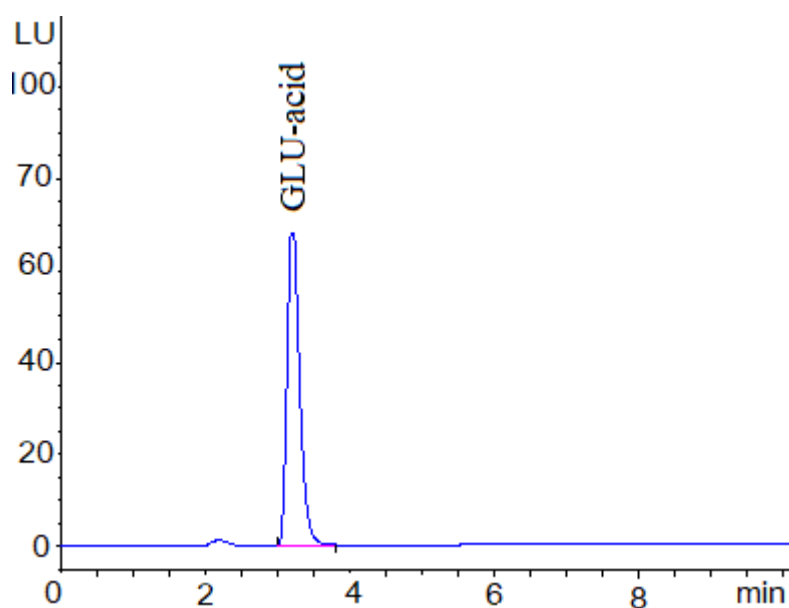


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора глутаминовой кислоты концентрацией 45,0 мкг/см³.

Fig. 1. Chromatogram of a standard solution of glutamic acid with concentration of 45.0 µg/cm³.

Подготовка анализируемых образцов

Экстракция ГК из пищевой продукции (хлебобулочные, плодоовощные, мясные, рыбные продукты, специи) с массовой долей жира менее 40%

От 0,5 до 2,0 г пробы помещали в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляли 50 см³ раствора HCl молярной концентрацией 0,02 моль/дм³, интенсивно встряхивали и помещали в ультразвуковую баню при температуре от 20 до 25°C на 10 мин (экстракции ГК из пищевой продукции с массовой долей жира более 20% проводится в ультразвуковой бане при температуре от 50 до 60°C в течение 10 мин, при этом колбу с пробой периодически интенсивно встряхивают (от 3 до 4 раз в течение 10 мин). Затем содержимое колбы доводили раствором HCl молярной концентрацией 0,02 моль/дм³ до метки на колбе и перемешивали. 10 см³ экстракта переносили в центрифужную пробирку вместимостью 15 см³ и центрифугировали при частоте вращения 10000 об/мин при температуре от 5°C до 10°C в течение 10 мин. При необходимости, верхний липидный слой центрифугата отбрасывали. Далее проводили дериватизацию ГК, содержащейся в экстракте, согласно процедуре, описанной при приготовлении градуировочных растворов. В данном случае вместо 0,5 см³ градуировочного раствора ГК используется 0,5 см³ экстракта.

Экстракция ГК из пищевой продукции с массовой долей жира более 40%

Отбирали среднюю пробу массой от 0,5 до 2,0 г, помещали в центрифужную пробирку вместимостью 50 см³, добавляли 30 см³ раствора HCl молярной концентрацией 0,02 моль/дм³ и 10 см³ гексана, встряхивали в течение 5 мин. Далее содержимое пробирки отстаивалось в течение 10 мин для достижения межфазного равновесия. При необходимости (отсутствие четкой межфазной границы, образование эмульсии) пробу центрифугировали при частоте вращения 10000 об/мин в течение 5 мин. Гексановую фракцию отбрасывали, водный слой количественно с помощью раствора HCl молярной концентрацией 0,02 моль/дм³ переносили в мерную колбу вместимостью 100 см³ доводили объем раствором HCl молярной концентрацией 0,02 моль/дм³ до метки и перемешивали. 10 см³ экстракта переносили в центрифужную пробирку вместимостью 15 см³ и центрифугировали при частоте вращения 10000 об/мин при температуре от 5°C до 10°C в течение 10 мин. При необходимости верхний липидный слой центрифугата отбрасывали. Далее проводили дериватизацию ГК, содержащейся в экстракте, согласно процедуре, описанной при приготовлении градуировочных растворов. В данном случае вместо 0,5 см³ градуировочного раствора ГК используется 0,5 см³ экстракта.

Расчет содержания ГК в анализируемых образцах

Массовую долю L-(+)-глутаминовой кислоты X , мг/кг, вычисляли по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V}{m} K, \quad (1)$$

где C – массовая концентрация L-(+)-глутаминовой кислоты, найденная по градуировочному графику, мкг/см³;

m – масса навески, г;

V – объем разведения, см³;

K – коэффициент разбавления.

Если площадь хроматографического пика L-(+)-глутаминовой кислоты в анализируемой пробе находится в диапазоне градуировочного графика, то $K=1$.

Если площадь хроматографического пика L-(+)-глутаминовой кислоты в анализируемой пробе превышает верхнюю точку градуировочного графика, то необходимо провести разбавление анализируемой пробы. Коэффициент разбавления в данном случае вычисляют по формуле:

$$K = \frac{V_2}{V_1}, \quad (2)$$

где V_1 – аликвота раствора пробы, взятая для разбавления, см³;

V_2 – объем пробы после разбавления, см³.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий ВЭЖХ определения ГК

Обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ с фотометрическим или флуоресцентным детектированием является наиболее экспрессным и доступным при анализе аминокислот.

Так как в большинстве молекул аминокислот, в том числе и ГК отсутствуют хромофорные группы (рис. 2), они, как правило, слабо поглощают ультрафиолетовый (УФ) и видимый свет, не обладают собственной флуоресценцией, соответственно чувствительность их определения с помощью спектрофотометрических и флуориметрических детекторов невысока. Для достижения удовлетворительного разделения и детектирования аминокислоты, как правило, переводят в гидрофобные соединения, поглощающие электромагнитное излучение, либо в сильно флуоресцирующие производные, то есть проводят предколоночную или постколоночную дериватизацию [3–14].

В качестве реагентов для дериватизации применяют диметиламиноазобензосульфонил хлорид (ДАБС) [3], фенилизотиоционат [6, 9, 10], ортофталевый альдегид с различными нуклеофильными агентами [7, 11–12 и др.

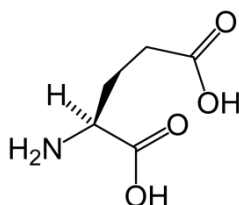


Рис. 2. Структурная формула глутаминовой кислоты.

Fig. 2. Structural formula of glutamic acid.

При этом условия проведения реакции, полнота ее протекания, а также устойчивость продуктов дериватизации могут сильно различаться в зависимости от используемого дериватизирующего агента. Соответственно условия разделения полученных производных аминокислот на хроматографической колонке также будут в значительной степени определяться физико-химическими свойствами соединений, участвующих в дериватизации.

Так как основными интерферирующими компонентами пробы пищевой продукции при определении ГК являются аминокислоты, то в данной работе было изучено разделение смеси 17 аминокислот на обращеннофазных хроматографических колонках при использовании разных дериватизирующих реагентов: диметиламиноазобензолсульфонил хлорида (ДАБС) и *орто*-фталевого альдегида (ОФА). Схемы протекания реакций дериватизации представлены на рисунках 3 и 4 соответственно. Для детекции аминокислот использовали диодноматричный детектор.

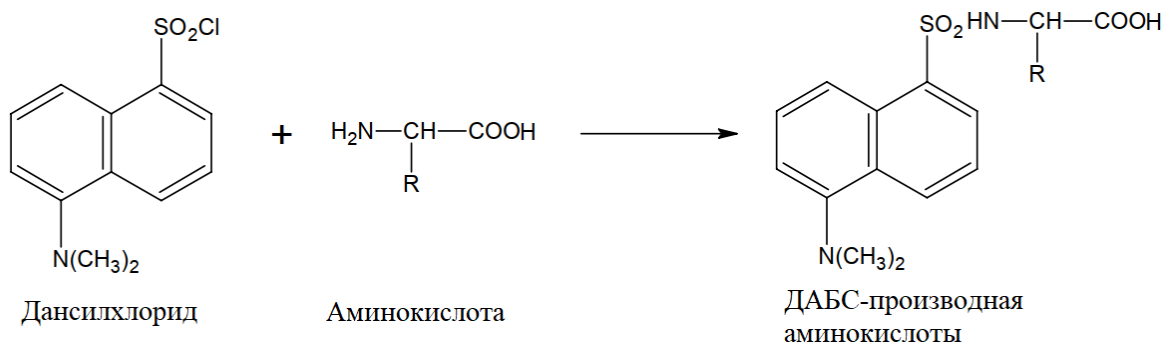


Рис. 3. Схема реакции дериватизации аминокислот дансилхлоридом (ДАБС).

Fig. 3. Scheme of the derivatization reaction of amino acids with DABS reagent.

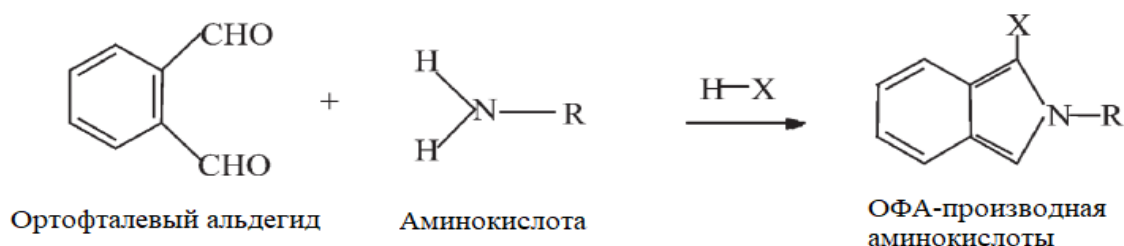


Рис. 4. Схема реакция дериватизации аминокислот с ортофталевым альдегидом (ОФА) в присутствии различных нуклеофильных реагентов.

Fig. 4. Scheme of the derivatization reaction of amino acids with orthophthalaldehyde (OFA) in the presence of various nucleophilic reagents.

Условия проведения реакции дериватизации стандартной смеси аминокислот с помощью ДАБС-реагента и условия ВЭЖХ анализа полученных производных аналогичны условиям, описанным в методике [3]. Реакция дериватизации протекает при 70°C в течение 12 мин. Разделение проводили на хроматографической колонке HyperClone ODS (C18) (250 мм x 4 мм x 5 мкм) в градиентном режиме подачи подвижной фазы, длина волны поглощения 436

нм. Хроматограмма стандартной смеси 17 аминокислот концентрацией 5 нмоль/см³ на рисунке 5.

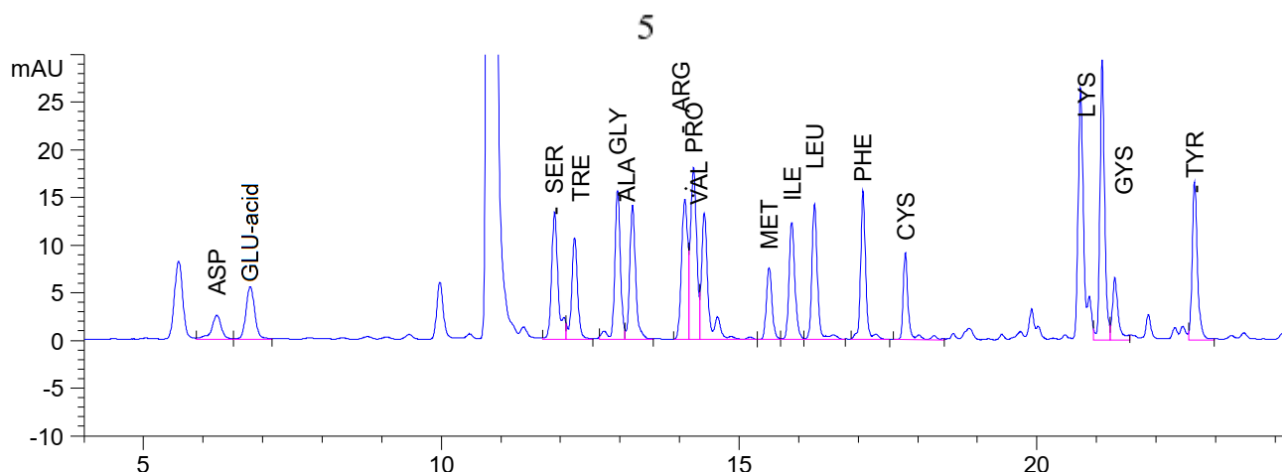


Рис. 5. Хроматограмма стандартного раствора смеси 17 аминокислот концентрацией 5 нмоль/см³.

Fig. 5. Chromatogram of a standard solution of a mixture of 17 aminoacids with concentration of 5 nmol/cm³.

Из хроматограммы видно, что ДАБС-производное глутаминовой кислоты (GLU-acid) выходит из хроматографической колонки на 7 минуте. Пик данного соединения хорошо отделен от пиков ДАБС-производных других аминокислот.

Дериватизацию аминокислот *орто*-фталевым альдегидом в присутствии нуклеофильного агента 3-меркаптопропионовой кислоты проводили согласно методике, описанной в работе [12]. Реакция дериватизации протекает при 25°C, 5 мин. Разделение проводили на хроматографической колонке Agilent Poroshel C18 (100 мм x 4,6 мм x 2,7 мкм) в градиентном режиме подачи подвижной фазы, длина волны поглощения 340 нм.

Как и в первом случае, ОФА-производное глутаминовой кислоты выходит из колонки одним из первых (на 4-ой минуте), пик данного соединения также хорошо отделяется от интерферирующих пиков производных других аминокислот. Поэтому описанные в работах [3] и [12] условия являются подходящими для решения задачи по определению свободной (добавленной) ГК в пищевой продукции.

Следует отметить, что использование ОФА в качестве дериватирующего агента является предпочтительным по сравнению с ДАБС, так как условия протекания реакции более мягкие (T=25°C, 5 мин), что позволяет автоматизировать данный процесс с помощью современных ВЭЖХ систем: проводить реакцию дериватизации в вials непосредственно перед вводом пробы в хроматограф. Анализ становится менее трудоемким и времязатратным. Получаемые ОФА-производные аминокислот являются флуоресцирующими соединениями, что дает возможность использовать флуоресцентный детектор для определения ГК и тем самым увеличить чувствительность методики ее определения, а также уменьшить влияние примесей в пробе путем увеличения кратности ее разбавления. Так как ОФА-

производная глутаминовой кислоты выходит из хроматографической колонки одной из первых, то использование градиентного режима элюирования (постепенное увеличения доли органического компонента подвижной фазы) позволяет быстро очистить колонку от интерферирующих примесей, при этом также наблюдается гашение флуоресценции ОФА-производных других аминокислот, что также способствует повышению селективности методики.

Оптимизация условий пробоподготовки

В зависимости от метода анализа и природы анализируемого пищевого продукта в литературных источниках описаны различные способы подготовки пробы для определения содержания ГК. Пищевые продукты могут содержать значительное количество ГК природного происхождения, как в свободных, так и в связанных формах. Свободные формы ГК выделяют из образцов с помощью экстракции.

В работах [7, 9, 11, 15] для экстракции ГК используются спиртовые, водно-спиртовые растворы и растворы соляной кислоты различной концентрации.

Представляло интерес изучить влияние состава экстрагента на полноту извлечения ГК из пищевой матрицы. Для этого в пробы завтрака сухого на основе картофеля, не содержащие внесенной ГК, была внесена данная добавка в количестве 5 г/кг.

В качестве экстрагентов использовали дистиллированную воду, растворы HCl с концентрацией 6 моль/дм³ и 0,02 моль/дм³, водно-этанольный раствор (соотношение растворителей 1:1). Для дериватизации и количественного определения внесенной ГК использовали ортофталевый альдегид и нуклеофильный агент 3-меркаптопропионовую кислоту.

В результате проведенных исследований было установлено, что состав исследуемых экстрагирующих смесей не оказывает существенного влияния на выделение добавленной ГК из данной пищевой матрицы. Степень извлечения составила 92 – 110% от внесенного количества. При этом наибольшие значения степени извлечения (98 – 110%) установлены при использовании в качестве экстрагентов растворов соляной кислоты. Использование 6 М раствора соляной кислоты приводит к завышению результатов анализа (степень извлечения > 100%). Это объясняется частичным гидролизом белка, в результате чего определяется не только внесенная ГК, но и ГК, высвободившаяся из белка при гидролизе. Поэтому оптимальным экстрагирующим раствором является 0,02 М соляная кислота. Степень извлечения при ее использовании составила 98%.

На рисунке 6 представлена хроматограмма, полученная при анализе завтрака сухого на основе картофеля с использованием данного экстрагента.

Как видно из рисунка 6, пик ГК четкий, хорошо отделен от других пиков, практически отсутствуют пики примесей на хроматограмме, что позволяет проводить количественное определение данной пищевой добавки на регламентируемом уровне.

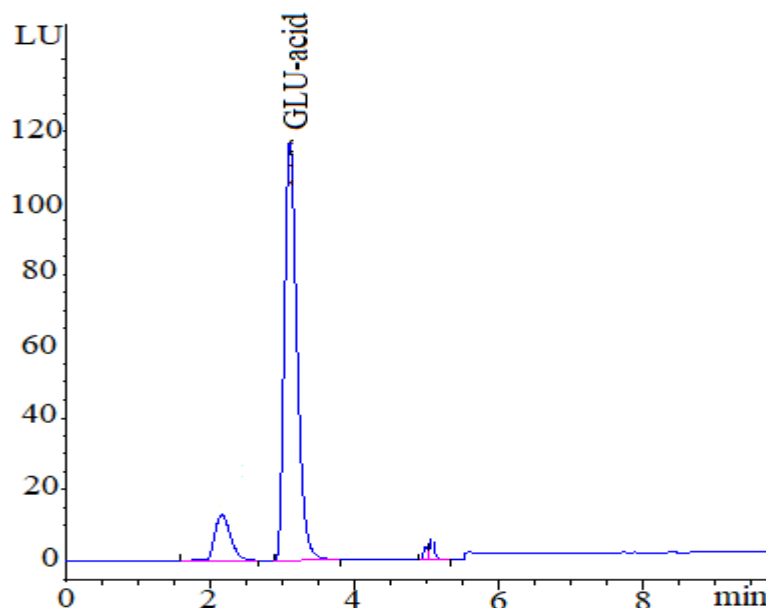


Рис. 6. Хроматограмма завтрака сухого на основе картофеля с содержанием ГК 5 г/кг.

Fig. 6. Chromatogram of dry potato-based breakfast with concentration of GA 5 g/kg.

Валидация методики определения свободной ГК в пищевой продукции

Валидация методики определения свободной глутаминовой кислоты в пищевой продукции проводилась согласно [16–21].

Для установления линейности диапазона измерений строили градуировочный график, откладывая по оси абсцисс концентрацию глутаминовой кислоты в градуировочном растворе (мкг/см^3), а по оси ординат площадь пика (LU·с). Расчет градуировочного графика проводился методом наименьших квадратов. Критерием линейности являлся коэффициент корреляции R^2 , который был не менее 0,99 (рисунок 7).

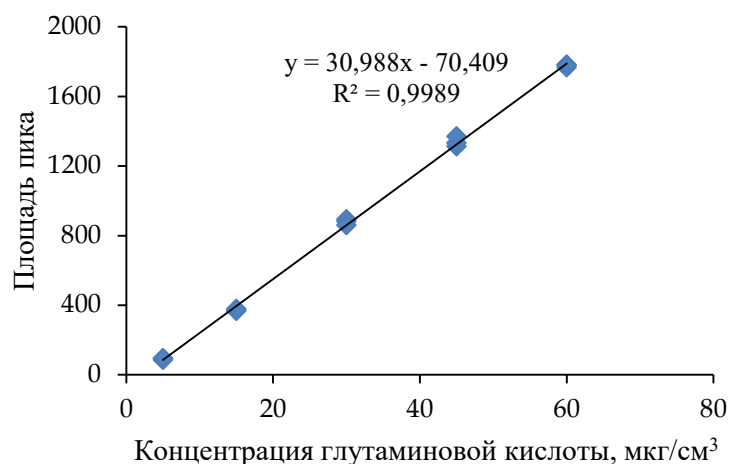


Рис.7. Градуировочный график глутаминовой кислоты в диапазоне концентраций 5 – 60 мкг/см^3 .

Fig.7. Calibration curve of glutamic acid in the range of concentrations 5 – 60 $\mu\text{g/cm}^3$.

Установленный диапазон определяемых концентраций глутаминовой кислоты составил 0,25 – 100 г/кг продукта. Нижний предел определения найден, исходя из наименьшего значения концентрации градуировочных растворов, величины навески продукта и конечного объема экстракта.

Статистические данные для оценки прецизионности получены по результатам анализа образцов рабочих проб следующих продуктов:

- сухарики ржаные (1 уровень – 500 мг/кг),
- чипсы (2 уровень – 3000 мг/кг),
- специи (6 уровень – 95000 мг/кг),

а также проб с добавками ГК:

- консервы рыбные для детского питания (3 уровень – 5000 мг/кг),
- мясо (свинина) (4 уровень – 6500 мг/кг),
- томатная паста (5 уровень – 75000 мг/кг).

Проведено по 9 определений ($n=2$) для каждого образца, выполненных с двумя изменяющимися факторами: время, оператор. Статистическая обработка полученных результатов, показала, что они достоверны при доверительной вероятности 95%. Значения величины относительного стандартного отклонения повторяемости и относительного доверительного интервала среднего значения не превышала критериев приемлемости – 5%, что свидетельствовало о прецизионности методики в условиях повторяемости. Рассчитанные на основании полученных данных относительные стандартные отклонения повторяемости (s_r), промежуточной прецизионности ($s_{I(TO)}$) для различных групп продуктов представлены в таблице 2.

Установленные значения s_r и $s_{I(TO)}$ определены по наибольшим рассчитанным значениям: $s_r=3,1\%$, $s_{I(TO)}=5,5\%$. Пределы повторяемости r и промежуточной прецизионности $R_{I(TO)}$ равны соответственно 8,7% и 15,3%.

Таблица 2. Рассчитанные значения m_j , s_{rj} , $s_{I(TO)j}$ для глутаминовой кислоты

Table 2. Calculated values m_j , s_{rj} , $s_{I(TO)j}$ for glutamic acid

Уровень, j	p_j	m_j^* , мг/кг	s_{rj} , %	$s_{I(TO)j}$, %
1	18	529	0,9	1,3
2	18	3028	3,1	4,0
3	18	5006	0,6	2,9
4	18	6504	1,9	5,5
5	18	73827	2,0	4,2
6	18	94671	1,8	2,9

*Среднее значение добавки по уровню

Величину степени извлечения (точность) метода получали как отношение результата измеренного содержания ГК в пробе с добавкой к расчетному количеству ГК в пробе с добавкой в соответствии с экспериментальными данными.

Анализ проб с добавкой ГК показал, что степень извлечения ГК для всех матриц составила не менее 95%.

Относительная стандартная неопределенность измерения свободной ГК в пищевой продукции, согласно разработанной методике, включала:

неопределенность, обусловленную случайными факторами (фактор повторяемости), неопределенность, обусловленную смещением метода (извлечение); неопределенность, обусловленную построением и использованием градуировочной характеристики и неопределенность, обусловленную подготовкой пробы, и составила 26,3% (таблица 3).

Таблица 3. Бюджет неопределенности глутаминовой кислоты в диапазоне концентраций 0,25–100 г/кг

Table 3. Uncertainty budget for glutamic acid over a range of concentrations 0.25–100 г/ kg

Источник неопределенности				Относительная суммарная стандартная неопределенность* u_c , %	Расширенная стандартная неопределенность измерения U , %
Повторяемость результатов измерений $u_{\text{Фер}}$, %	Извлечение $u_{\text{(Rec cp)}}$, %	Построение и использование градуировочной характеристики $u_{\text{гр х}}$, %	Подготовка пробы $u_{\text{п}}$, %		
3,89	6,4	10,8	0,11	13,1	26,3

*Относительная суммарная стандартная неопределенность вычисляется по формуле:

$$u_c = \sqrt{\sum u_i^2}$$

Практическое использование разработанной методики определения свободной ГК в пищевой продукции

Разработанная и валидированная методика применена для контроля содержания свободной ГК в пищевой продукции. Данной методикой проанализированы 146 образцов пищевой продукции, отобранной в торговой сети Республики Беларусь. Вся продукция условно разделена на 5 групп, в зависимости от типа пищевой матрицы.

Практически все проанализированные образцы содержали свободную ГК в количестве от 0,3 г/кг до 5,6 г/кг. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты исследований пищевой продукции на содержание ГК

Table 4. Results of studies of food products for the content of GA

Группа пищевой продукции	Количество исследований	Диапазон содержания ГК по группам пищевой продукции, г/кг
Чипсы, сухарики	24	1,0 – 5,0
Продукты быстрого приготовления (лапша, супы, пюре, салаты) в готовом продукте	48	0,6 – 3,3
Мясная продукция (консервы, паштет, колбасные изделия, п/ф замороженные: пельмени, блинчики, котлеты и т.п)	40	0,3 – 2,5
Рыбная продукция (рыба соленая, икра, консервы, п/ф замороженные: палочки, бургеры и т.п)	26	0,5– 4,7
Соусы	8	1,0 – 5,6
Итого	146	

Среднее значение содержания ГК в пределах групп представлена на рисунке 8.

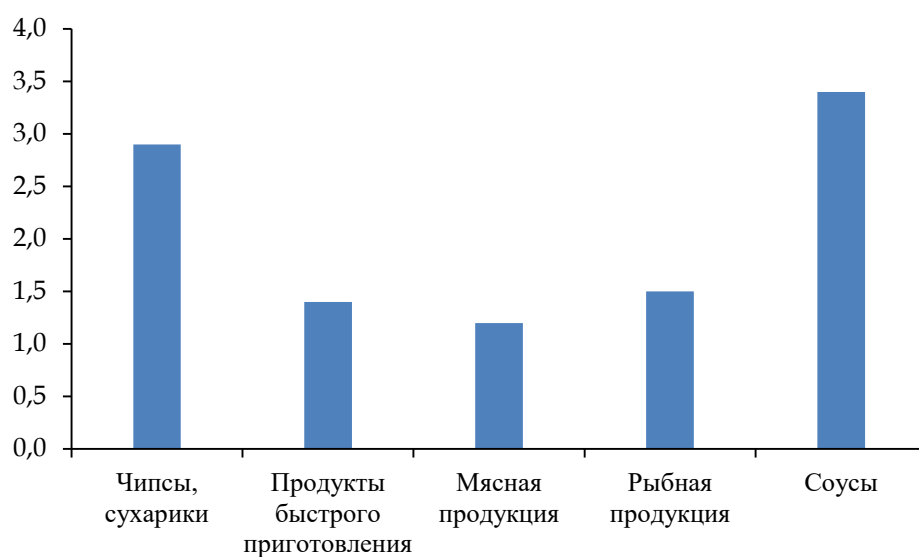


Рис. 8. Среднее значение содержания ГК в группах пищевой продукции, г/кг.

Fig. 8. Average content of glutamic acid in groups of food product, g/kg.

Из рисунка 7 видно, что максимальное количество свободной ГК содержалось в таких продуктах, как чипсы, сухарики и соусы, минимальное количество свободной ГК обнаружено – в мясной и рыбной продукции.

Следует отметить, что содержание свободной ГК во всех исследованных образцах ниже максимально допустимого уровня, установленного в требованиях технического регламента Евразийского экономического союза [1].

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований разработаны оптимальные условия пробоподготовки и хроматографического анализа для количественного определения свободной ГК в пищевой продукции, что позволило разработать и валидировать простую в исполнении методику определения ГК с помощью ВЭЖХ–ФЛД. Диапазон количественного измерения методики составляет 0,25–100 г/кг. Максимальная расширенная неопределенность полученных результатов не превысила 26,3% на нижнем уровне диапазона измерения. Данная методика позволяет с высокой точностью и чувствительностью определять ГК и осуществлять контроль за ее содержанием во всех видах пищевой продукции.

Работа выполнена в рамках ОНТП «Гигиеническая безопасность», задание 02.08 «Разработать и внедрить метод оценки риска здоровью, ассоциированного с содержанием усилителей вкуса и аромата в пищевых продуктах (на примере глутаминовой кислоты и ее солей)»

ACKNOWLEDGEMENT

The work was carried out within the framework of the ONTP "Hygienic Safety, task 02.08 "Develop and implement a method for assessing the health risk associated with

the content of flavor and aroma enhancers in food products (for example, glutamic acid and its salts)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests

Список литературы:

1. Mortensen A., et al. (2017). Re-evaluation of glutamic acid (E 620), sodium glutamate (E 621), potassium glutamate (E 622), calcium glutamate (E 623), ammonium glutamate (E 624), and magnesium glutamate (E 625) as food additives. *EFSA Journal*, 15(7), 90 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4910>
2. ТР ТС 029/2012. Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств. Минск: Госстандарт, 2014. 272 с.
3. МВИ.МН 1363-2000. Метод определения аминокислот в продуктах питания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Минск: Республиканский научно-практический центр по экспертной оценке качества и безопасности продуктов питания, 2000. 23 с.
4. ГОСТ 32195-2013 (ISO 13903:2005). Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот. Минск: Госстандарт, 2016. 24 с.
5. ГОСТ 34230-2017. Продукция соковая. Определение свободных аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Минск: Госстандарт, 2019. 20 с.
6. ГОСТ 34448-2018. Мясо и мясные продукты. Метод определения L-(+)-глутаминовой кислоты. Минск: Госстандарт, 2019. 20 с.
7. Руденко А.О., Карцова Л.А., Снарский С.И. (2010). Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот. *Сорбционные и хроматографические процессы*, 10(2), 223–230.
8. Tsvetkova D., Pencheva I., Obreshkova D. (2010). Identification and determination of L-glutamic acid and L-arginine by HPLC in food additives. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 52(2), 219–228.
9. Степанов К.В., Пирогов А.В., Дикунец М.А., Шпигун О.А. (2005). Получение фенилтиогидантоинов аминокислот для количественного анализа аминокислотного состава белков методом капиллярного электрофореза. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*, 46(6), 395–399.
10. Чернобровкин М.Г., Кольцова Н.В., Шепелев Б.Н. (2004). Определение аминокислот в препарате «Элтацин». *Фармация*, 53(5), 18–20.
11. Бекетов В.И., Воронина Р.Д., Зоров Н.Б. (2012). Флуориметрическое определение аминокислот и фотохимическая устойчивость продуктов их реакции с ортофталевым альдегидом под воздействием мощного импульсного лазерного излучения. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*, 53(4), 228–233.
12. Jajic I., Krstovic S., Glamocic D., Jaksic S., Abramovic B. (2013). Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78 (6), 839–850. <https://doi.org/10.2298/JSC120712144J>
13. Gatte R., Gioia M.G., Pieta A.M. (2002). Phanquenone: a useful fluorescent pre-chromatographic derivatization reagent for liquid chromatographic analyses of aminoacid dosage form. *Analytica Chimica Acta*, 1(2), 11–20. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01011-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01011-5)

14. Krishna V.N., et al. (2010). Analysis of monosodium L-Glutamate in food products by High-Performance thin layer chromatography. *Journal Young Pharm*, 2(3), 297–300.
<https://doi.org/10.4103/0975-1483.66795>
15. Afraa A, Mounir A, Zaid A (2013). Colorimetric determination of monosodium glutamate in food samples using L-glutamate oxidase. *Clinical Journal of Applied and Environmental Biology*, 19(6), 1069-1072. <http://dx.doi.org/10.3724/SP.J.1145.2013.01069>
16. СТБ ИСО 5725–2–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений в 6 ч. – Ч. 2: Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода определений. Минск: Госстандарт, 2002. 42 с.
17. СТБ ИСО 5725–3–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений в 6 ч. – Ч. 3: Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений. Минск: Госстандарт, 2002. 36 с.
18. СТБ ИСО 5725–4–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений в 6 ч. – Ч. 4: Основные методы определения правильности стандартного метода определений. Минск: Госстандарт, 2002. 32 с.
19. СТБ ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике. Минск: Госстандарт, 2002. 48 с.
20. ГОСТ 8.010-2013 Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Методики выполнения измерений. Основные положения. Москва: Стандартинформ, 2019. 99 с.
21. СТБ ISO 21748-2019 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерений. Минск: Госстандарт, 2019. 40 с.

References:

1. Mortensen A., et al. (2017). Re-evaluation of glutamic acid (E 620), sodium glutamate (E 621), potassium glutamate (E 622), calcium glutamate (E 623), ammonium glutamate (E 624), and magnesium glutamate (E 625) as food additives. *EFSA Journal*, 15(7), 90.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4910>
2. TR CU (Technical Regulation) 029/2012. Safety requirements for food additives, flavouring agents and processing aids. Minsk: Gosstandart, 2014. 272 p. (in Russ.).
3. MVI MN 1363-2000. Method of determining amino acids in food by high-performance liquid chromatography. Minsk: Repub. Scientific Practical Center for Expert Assessment of Food Quality and Safety, 2000. 23 p. (in Russ.).
4. GOST (State Standard) 32195-2013 (ISO 13903:2005). Feed, compound feed. Method for determining the content of amino acids. Minsk: Gosstandart, 2016. 24 p. (in Russ.).
5. GOST (State Standard) 34230-2017. Juice products. Determination of free amino acids by high performance liquid chromatography. Minsk: Gosstandart, 2019. 20 p. (in Russ.).
6. GOST (State Standard) 3448-2018. Meat and meat products. Method for determination of L-(+)-glutamic acid. Minsk: Gosstandart, 2019. 20 p. (in Russ.).
7. Rudenko, A.O., Kartsova, L.A., Snarskiy, S.I. (2010). High performance liquid chromatography determination of the major amino acids in complex biological objects using phenylisothiocyanate derivatization. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protsessy = Sorption and chromatography processes*, 10(2), 223–230 (in Russ.).
8. Tsvetkova, D., Pencheva, I., Obreshkova, D. (2010). Identification and determination of L-glutamic acid and L-arginine by HPLC in food identification and determination of L-glutamic acid and L-arginine by HPLC in food additives. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 52(2), 219–228.
9. Stepanov, K.V., Pirogov, A.V., Dikunetz, M.A., Shpigun, O.A. (2005). A technique of synthesis of amino acid phenylthiohydantoines for the quantitative protein compositional analysis using

- capillary electrophoresis. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya = Moscow University Chemistry Bulletin*, 46(6), 395–399 (in Russ.).
10. Chernobrovkin, M.G., Kol'tsova, N.V., Shepelev, B.N. (2004). Determination of amino acids in the drug "Eltacin". *Pharmacy*, 53(5), 18–20 (in Russ.).
 11. Beketov, V.I., Voronina, R.D., Zorov, N.B. (2012). Fluorimetric determination of amino acids and photochemical stability of the products of their reaction with *orto*-phthalic aldehyde under irradiation of a high-power pulsed laser. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya = Moscow University Chemistry Bulletin*, 53(4), 228–233 (in Russ.).
 12. Jajic, I., Krstovic, S., Glamocic, D., Jaksic, S., Abramovic, B. (2013). Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(6), 839–850. <https://doi.org/10.2298/JSC120712144J>
 13. Gatte, R., Gioia, M.G, Di Pietra, A. M. (2002). Phanquenone: a useful fluorescent pre-chromatographic derivatization reagent for liquid chromatographic analyses of aminoacid dosage form. *Analytica Chimica Acta*. 1(2), 11–20. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01011-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01011-5)
 14. Krishna, V.N., et al. (2010). Analysis of monosodium L-Glutamate in food products by High-Performance thin layer chromatography. *Journal Young Pharm*, 2(3), 297–300. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.66795>
 15. Afraa, A, Mounir, A, Zaid, A (2013). Colorimetric determination of monosodium glutamate in food samples using L-glutamate oxidase. *Clinical Journal of Applied and Environmental Biology*, 19(6), 1069–1072. <http://dx.doi.org/10.3724/SP.J.1145.2013.01069>
 16. STB ISO 5725-2-2002 Accuracy (correctness and precision) of measurement methods and results in 6 hours - Part 2: The main method for determining the repeatability and reproducibility of the standard method of determination. Minsk: Gosstandart, 2002. 42 p. (in Russ.).
 17. STB ISO 5725-3-2002 Accuracy (correctness and precision) of measurement methods and results in 6 hours - Part 3: Intermediate indicators of precision of a standard measurement method. Minsk: Gosstandart, 2002. 36 p. (in Russ.).
 18. STB ISO 5725-4-2002 Accuracy (correctness and precision) of measurement methods and results in 6 hours - Part 4: Basic methods for determining the correctness of the standard method of determination. Minsk: Gosstandart, 2019. 32 p. (in Russ.).
 19. STB ISO 5725-6-2002 Accuracy (correctness and precision) of measurement methods and results. Part 6. Using precision values in practice. Minsk: Gosstandart, 2002. 48 p. (in Russ.).
 20. GOST 8.010-2013 State System for Ensuring the Uniformity of Measurements (GSI). Measurement techniques. Basic provisions. Moscow: Standartinformt, 2019. 20 p. (in Russ.).
 21. STB ISO 21748-2019 Guidelines for the use of estimates of repeatability, reproducibility and correctness in the evaluation of measurement uncertainty. Minsk: Gosstandart, 2019. 40 p. (in Russ.).