

УДК 663.25:543

UDC 663.25:543

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРОТОНОВОГО АЛЬДЕГИДА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**METHODS OF DETERMINATION OF CROTONALDEHYDE IN FOOD**

Кушнерева Елена Викторовна
к.т.н.

Kushnereva Elena Victorovna
Cand.Tech.Sci.

Государственное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии, Краснодар, Россия

State Scientific organization North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture of the Russian Academy of agricultural sciences, Krasnodar, Russia

Представлен обзор существующих методов определения кротонового альдегида в пищевых продуктах. Обоснована необходимость контроля данного компонента в пищевой продукции, в том числе винодельческой, в виду его токсичности и вероятности образования в процессе микробного синтеза и химических превращения. Приведено описание разработанного качественного метода определения содержания кротонового альдегида в столовых винах с помощью спектрофотометрии

The article presents a review of the existing methods for the determination of crotonaldehyde in food. The necessity of this component in the control of food products, including wine, is visible because of its toxicity and the probability of formation during microbial synthesis and chemical transformations. The article describes the developed qualitative method of determining the content of crotonaldehyde in table wines with spectrophotometry

Ключевые слова: ПИЩЕВАЯ ПРОДУКЦИЯ, ВИНО, КРОТОНОВЫЙ АЛЬДЕГИД, МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, КАЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД, СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

Keywords: FOOD PRODUCTS, WINE, CROTONALDEHYDE, METHODS OF DETERMINATION, LIQUID CHROMATOGRAPHY, GAS CHROMATOGRAPHY, HIGH-QUALITY METHOD, SPECTROPHOTOMETRY

Введение:

Обеспечение безопасности пищевой продукции, в том числе винодельческой, является одной из важнейших и актуальных стратегических задач любого государства, заботящегося о здоровье своих граждан. Необходимость ужесточения мер, направленных на выявление и уничтожение некачественной и небезопасной продукции, обусловлена, в первую очередь, возросшим числом случаев отравления и повышением уровня смертности населения, в том числе от суррогатного алкоголя. Многие продукты питания производятся путем микробного синтеза, в результате таких биохимических превращений могут образовываться побочные вещества, обладающие токсичным действием. К ним относятся микотоксины, биогенные амины и др.

Исследования алкогольных напитков учеными разных стран мира [1,2,3] свидетельствуют о том, что в алкогольной продукции могут

содержаться в небольших количествах 2-пропеналь (акролеин, акриральдегид) и 2-бутеналь (кротоновый альдегид). Как указывают некоторые авторы [4] эти компоненты могут образовываться в результате жизнедеятельности бактерий или в качестве побочных продуктов в процессе перегонки.

Кротоновый альдегид (2-бутеналь) является раздражающим веществом, входит в список «особо опасных веществ», указанных в Emergency Planning and Community Right-to-Know Act федерального закона США. Широко распространен в природе. Содержится в некоторых продуктах питания, например, в соевом масле [5]. Кротоновый альдегид относится к нестойким соединениям, на воздухе постепенно окисляется. Это вещество является сильным лакриматором, при попадании на кожу вызывает местную воспалительную реакцию с последующим изъязвлением верхнего слоя кожи. ПДК составляет 0,5 мг/м³. [6]. Данное вещество входит в перечень вредных веществ 3 класса опасности, содержание которого регламентируется в питьевой воде [7].

Исследованиями японских ученых установлено, что кротоновый альдегид вызывает болезнь Альцгеймера [8]. Токсичные свойства кротонового альдегида определяются его высокой реакционной способностью.

Известно, что кротоновый альдегид может содержаться в сигаретном дыме [9], в дыме, с помощью которого коптят рыбные продукты [10], а также в алкогольных напитках [11].

Важным аспектом проблемы является идентификация и количественное определение кротонового альдегида в пищевых продуктах в виду его особенных химических свойств.

В литературе приводится широкий набор методов определения содержания кротонового альдегида в пищевых продуктах как с помощью жидкостной, так и газовой хроматографии. Учеными [10] предложен метод

определения кротонового альдегида в составе других альдегидов в рыбных продуктах путем жидкостной хроматографии с предварительной дериватизацией 2,4-динитрофенилгидразином и при длине волны 360 нм.

Авторы [11] предложили способ определения кротонового альдегида (2-бутеналь) в спиртосодержащих средах с помощью жидкостной хроматографии. Сущность метода заключается в предварительной перегонке спиртосодержащей смеси и анализе отгона на жидкостном хроматографе оснащенной колонкой RP-18 и спектрофотометрическим детектором 220 нм. В качестве элюента используется смесь метанол/вода в соотношении 25/75 соответственно. Предел обнаружения 2-бутенала – 50 мкг.

В 2001 году на территории Российской Федерации вступил в силу ГОСТ Р 51786-2001 [12], устанавливающий газохроматографический метод определения подлинности водки и спирта этилового из пищевого сырья по содержанию токсичных микропримесей: сивушного масла (2-бутанола, 1-пентанола, 1-гексанола), кротонового альдегида, кетонов (ацетона и 2-бутанона), ароматических спиртов (бензилового и 2-фенилэтанола), ароматического альдегида (бензальдегида), этилового эфира, сложных эфиров (изобутилацетата, этилбутирата), диэтилфталата.

Данный метод предусматривает одновременное определение содержания токсичных микропримесей, характерных для водки и спирта: метилового спирта (метанолом), сивушного масла (2-пропанола, 1-пропанола, изобутилового спирта, 1-бутанола, изоамилового спирта), уксусного альдегида, сложных эфиров (метилацетата, этилацетата). Диапазон измеряемых объемных долей метилового спирта составляет от 0,0001 до 0,1%, массовых концентраций остальных токсичных микропримесей - от 0,5 до 1000 мг/дм³.

Согласно данному стандарту, водка или спирт этиловый, в которых идентифицирован кротоновый альдегид, относятся к продуктам, полученным не из пищевого сырья, то есть фальсифицированными.

Исследования Савчука С.А. [13] позволили установить, что кротоновый альдегид не является маркером подлинности спиртосодержащих продуктов и его наличие характерно для некоторых пищевых продуктов и для этилового спирта любого происхождения.

В 2007 году вступил в действие ГОСТ Р 52788-2007 [14]. Настоящий стандарт распространяется на этиловый спирт, полученный из пищевого или непищевого сырья, денатурированный кротоновым альдегидом, и спиртосодержащую пищевую продукцию, а также спиртные напитки и устанавливает газохроматографический метод определения объемной доли кротонового альдегида. Диапазон измеряемых объемных долей кротонового альдегида составляет от 0,10 % до 0,40 %.

На базе научного центра виноделия ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии в 2013г. был разработан, апробирован и аттестован метод определения кротонового альдегида с помощью газовой хроматографии [15].

Настоящий стандарт распространяется на продукцию винодельческую и устанавливает газохроматографический метод определения массовой концентрации кротонового альдегида. Диапазон измеряемых массовых концентраций – от 0,2 до 5,0 мг/дм³. Разработанный метод основан на хроматографическом разделении летучих органических примесей, в том числе кротонового альдегида, с использованием капиллярных колонок и последующем детектировании пламенно-ионизационным детектором с применением градуировки методом внутреннего стандарта. Разработанный метод хорошо зарекомендовал себя при анализе алкогольной продукции на наличие кротонового альдегида.

Однако, недостатками вышеописанных методов определения кротонового альдегида в пищевых продуктах с помощью газовой и жидкостной хроматографии являются значительные трудо- и материалозатраты. Используемое оборудование является современным, высокоточным, но дорогостоящим в приобретении и использовании.

Экспериментальная часть:

С целью разработки метода определения кротонового альдегида в винодельческой продукции необходимо решить следующие задачи:

1. осуществить подбор оптимальных параметров и условий анализа кротонового альдегида в вине;
2. подобрать условия для выделения кротонового альдегида из анализируемой пробы вина;
3. провести сличительные испытания разработанного метода с существующими аттестованными методами определения кротонового альдегида;
4. осуществить апробацию разработанного метода в лабораторных условиях на опытных образцах винодельческой продукции.

Проведенные исследования по подбору оптимальных условий для анализа кротонового альдегида в винодельческой продукции, в частности винах столовых, позволили разработать качественный метод определения кротонового альдегида в вине с помощью спектрофотометрии.

В основу разработанного метода положен принцип качественной реакции, основанный на взаимодействии веществ с образованием окрашенного продукта.

Существует метод определения кротонового альдегида в воздухе рабочей зоны, основанный на образовании окрашенного соединения в результате взаимодействия кротонового альдегида с бензидином в уксуснокислой среде [16]. Недостатком вышеописанного способа является

то, что присутствие в анализируемой среде ацетальдегида, который всегда присутствует в вине, мешает выполнению анализа.

Известно, что ненасыщенные альдегиды при взаимодействии с сульфаниловой кислотой образуют окрашенный продукт реакции [17]. Этим свойством обладают акролеин и кротоновый альдегид, присутствие других альдегидов в пробе не мешает протеканию качественной химической реакции.

В ходе исследований были поставлены эксперименты по определению содержания кротонового альдегида методом прямого добавления сульфаниловой кислоты в присутствии нитрита натрия в вино, однако были получены отрицательные результаты. Этот факт объясним присутствием в вине фенольных веществ, обуславливающих окраску вина и мешающие определению оптической плотности образовавшегося в ходе химической реакции кротонового альдегида с сульфаниловой кислотой окрашенного продукта.

Трудности, возникающие при исследовании таких объектов как вино, обусловлены следующими причинами: сложность разделения многокомпонентных систем, очистки от балластных веществ и примесей традиционными методами (например, экстракцией в системе жидкость - жидкость), а также сложность концентрирования разбавленных растворов. Решение такого рода проблем возможно при применении на стадии пробоподготовки метода твердофазной экстракции, позволяющего осуществлять одновременное выделение и концентрирование целевых компонентов. Такой подход дает возможность получения веществ в чистом виде, что в дальнейшем позволяет проводить идентификацию методом капиллярного электрофореза. Кроме того, использование твердофазной экстракции расширяет пределы применения методов тонкослойной и газовой хроматографии.

Пробоподготовка осуществляется с помощью патронов, заполненных силикагелем или модифицированными сорбентами на его основе. Подбор и варьирование типов патронов, а также применение различных растворителей в качестве элюентов дает возможность проводить одновременно процессы разделения, выделения, очистки и концентрирования веществ с высокой скоростью и эффективностью.

Результаты исследований показали, что, несмотря на эффективность очистки экстракта от нежелательных примесей, применение концентрирующих патронов не приводит к положительным результатам по определению кротонового альдегида в пробе вина.

При анализе спиртосодержащих продуктов очень часто применяют метод перегонки, т.е. способ отделения веществ, основанный на различных температурах кипения. Результаты исследований показали, что полученный в результате перегонки отгон пробы вина содержит кротоновый альдегид в случае его присутствия в опытном образце вина.

Экспериментальным путем были подобраны концентрации и объемы необходимых химических реактивов для идентификации кротонового альдегида в отгоне вина. Добавление к отгону вина, содержащему кротоновый альдегид, химических растворов в следующей последовательности: соляной кислоты, нитрита натрия, сульфаниловой кислоты и сернистой кислоты, приводит к получению окрашенного продукта химической реакции, оптическую плотность которого определяют при длине волны 435 нм. В качестве раствора сравнения служит контроль, который готовят одновременно и аналогично пробе.

Продолжительность анализа – не более 60 мин.

Анализ оптической плотности опытных образцов в сравнении с контролем осуществляли с помощью спектрофотометра «UNICO» модель 1201 (Производитель: ООО «Юнико-СиС», г. Санкт-Петербург).

При анализе использовали следующие реактивы и растворы:

- азотная кислота по ГОСТ 4461-77;
- сульфаниловая кислота по ГОСТ 5821-78;
- натр едкий по ГОСТ 2263-79;
- 0,3 % раствор нитрита натрия в воде.
- кислота соляная, разбавленная 1:4.
- кислота серная, разбавленная 1:4;
- раствор сульфанилата натрия готовится путем растворения 8 г сульфаниловой кислоты в 150 мл 2-% раствора едкого натра;
- кротоновый альдегид производства фирмы «Merck» с массовой долей основного вещества не менее 98 %.

При работе со спектрофотометром использовали кюветы толщиной поглощающего слоя 10мм.

Проведенные сличительные испытания и апробация разработанного качественного метода определения кротонового альдегида в вине показали, что предел обнаружения равен 0,1 мг/дм³.

Выводы:

В процессе выполнения работы осуществлен анализ существующих методов определения кротонового альдегида в пищевых продуктах. Разработан и апробирован в лабораторных условиях качественный метод определения содержания кротонового альдегида в столовых винах, основанный на взаимодействии кротонового альдегида с сульфаниловой кислотой в присутствии нитрита натрия с образованием окрашенного в желтый цвет красителя и последующем измерении окрашенного продукта реакции при длине волны 435 нм.

Работа выполнена в рамках регионального гранта РФФИ 13-08-96506 р_юг_а «Исследование механизмов и закономерностей биосинтеза биогенных аминов и кротонового альдегида биосистемами дрожжей и молочнокислых бактерий».

Библиографический список

- 1 Dubois, P. *Ann Technol Agric* / P. Dubois, A. Parfait, J. Dekimpe. – 1973.- 22:131
- 2 Sponholz, W-R *Z Lebensm Unters Forsch* / W-R Sponholz.-1982.- 174:458
- 3 Greenhoff, K. Analysis of beer carbonyls at the part per billion level by combined liquid chromatography and high pressure liquid chromatography / K. Greenhoff, R. E. Wheeler // *Journal of the Institute of Brewing*. -1981. - №, 86. –P. 35–41.
- 4 Serjak WC, Day C, Van Lanen JM, Boruff CS (1954) *Appl Microbiol* 2:4
- 5 Schulz, R. P. Crotonaldehyde and Crotonic Acid / R. P. Schulz, J. Blumenstein, C. Kohlpaintner // *Ullmann's Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley-VCH, Weinheim: 2005.
- 6 Kirk Othmer encyclopedia, 3 ed., v. 7, N.Y., 1979, p. 207.
- 7 СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения»
- 8 Kawaguchi-Niida, M. Crotonaldehyde accumulates in glial cells of Alzheimer's disease brain / M. Kawaguchi-Niida // *Acta Neuropathol.*- 2006.- 111: 422–429
- 9 Kataoka, H. Determination of Aliphatic and Aromatic Aldehydes in Cigarette Smoke by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection / H. Kataoka, A. Sumida, M. Makita // *Chromatographia* Vol. 44, No. 9/10, May 1997. – P. 491-496.
- 10 Varlet, V. Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurrence and mechanisms of formation / V. Varlet, C. Prost, T. Serot / *Food Chemistry* 105. – 2007. - P. 1536–1556.
- 10 Von Drews B, Specht H, Brfimmer J-M (1965) *Branntweinwirtschaft* 105:77
- 11 Lehtonen, P. Liquid Chromatographic Determination of 2-Propenal (Acrolein) and 2-Butenal (Crotonaldehyde) from Water-Ethanol Mixtures / P. Lehtonen, R. Laakso, E. Puputti // *Z Lebensm Unters Forsch*. – 1984. - 178: P. 487-489.
- 12 ГОСТ Р 51786-2001 «Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности».
- 13 Савчук, С.А. Новые методические подходы к контролю качества алкогольной продукции и к выявлению наркотических веществ в биологических средах хроматографическими и хромато-масс-спектрометрическими методами: Автореф. дис. ...д-ра хим. наук. – С.-П., 2012.-48с.
- 14 ГОСТ Р 52788-2007 «Спирт этиловый и спиртосодержащая продукция. Газохроматографический метод определения содержания кротонового альдегида (денатурирующей добавки)».
- 15 Марковский, М.Г. Кротоновый альдегид: причины образования и методика определения / Марковский М.Г., Гугучкина Т.И., Агеева Н.М. // *Биологизация и экологизация технологии производств – приоритетные направления развития виноделия: Научные труды ГНУ СКЗНИИСиВ (Материалы научно-практического форума «Роль экологизации и биологизации в повышении эффективности производства плодовых культур, винограда и продуктов их переработки»)*, г. Краснодар – 2013. – Том. 4. – С. 185-187.
- 16 МУК 4.1.241-96 Фотометрическое измерение концентрации метакролеина в воздухе рабочей зоны.
- 17 Технические условия на метод определения кротонового альдегида в воздухе [электронный ресурс: точка доступа http://www.libussr.ru/doc_ussr/usr_6652.htm]

References

- 1 Dubois, P. *Ann Technol Agric* / P. Dubois, A. Parfait, J. Dekimpe. – 1973.- 22:131
- 2 Sponholz, W-R *Z Lebensm Unters Forsch* / W-R Sponholz.-1982.- 174:458

3 Greenhoff, K. Analysis of beer carbonyls at the part per billion level by combined liquid chromatography and high pressure liquid chromatography / K. Greenhoff, R. E. Wheeler // Journal of the Institute of Brewing. -1981. - №, 86. –P. 35–41.

4 Serjak WC, Day C, Van Lanen JM, Boruff CS (1954) Appl Microbiol 2:4

5 Schulz, R. P. Crotonaldehyde and Crotonic Acid / R. P. Schulz, J. Blumenstein, C. Kohlpaintner // Ullmann's Encyclopedia of Chemical Technology, Wiley-VCH, Weinheim: 2005.

6 Kirk Othmer encyclopedia, 3 ed., v. 7, N.Y., 1979, p. 207.

7 SanPiN 2.1.4.1074-01 «Pit'evaja voda. Gigienicheskie trebovanija k kachestvu vody centralizovannyh sistem pit'evogo vodosnabzhenija»

8 Kawaguchi-Niida, M. Crotonaldehyde accumulates in glial cells of Alzheimer's disease brain / M. Kawaguchi-Niida //Acta Neuropathol.- 2006.- 111: 422–429

9 Kataoka, H. Determination of Aliphatic and Aromatic Aldehydes in Cigarette Smoke by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection / H. Kataoka, A. Sumida, M. Makita // Chromatographia Vol. 44, No. 9/10, May 1997. – P. 491-496.

10 Varlet, V. Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurrence and mechanisms of formation / V. Varlet, C. Prost, T. Serot / Food Chemistry 105. – 2007. - R. 1536–1556.10 Von Drews B, Specht H, Brfimmer J-M (1965) Branntweinwirtschaft 105:77

11 Lehtonen, P. Liquid Chromatographic Determination of 2-Propenal (Acrolein) and 2-Butenal (Crotonaldehyde) from Water-Ethanol Mixtures / P. Lehtonen, R. Laakso, E. Puputti / Z Lebensm Unters Forsch. – 1984. - 178: P. 487-489.

12 GOST R 51786-2001 «Vodka i spirt jetilovyj iz pishheвого syr'ja. Gazohromatograficheskij metod opredelenija podlinnosti».

13 Savchuk, S.A. Novye metodicheskie podhody k kontrolju kachestva alkohol'noj produkcii i k vyjavleniju narkoticheskikh veshhestv v biologicheskikh sredah hromatograficheskimi i hromato-mass-spektrmetricheskimi metodami: Avtoref. dis. ...d-ra him. nauk. – S.-P., 2012.-48s.

14 GOST R 52788-2007 «Spirt jetilovyj i spirtosoderzhashhaja produkcija. Gazohromatograficheskij metod opredelenija sodержaniya krotonovogo al'degida (denaturirujushhej dobavki)».

15 Markovskij, M.G. Krotonovyj al'degid: prichiny obrazovaniya i metodika opredelenija / Markovskij M.G., Guguchkina T.I., Ageeva N.M. // Biologizacija i jekologizacija tehnologii proizvodstv – prioritetye napravlenija razvitija vinodelija: Nauchnye trudy GNU SKZNIISiV (Materialy nauchno-prakticheskogo foruma «Rol' jekologizacii i biologizacii v povyshenii jeffektivnosti proizvodstva plodovyh kul'tur, vinograda i produktov ih pererabotki»), g. Krasnodar – 2013. – Tom. 4. – S. 185-187.

16 MUK 4.1.241-96 Fotometricheskoe izmerenie koncentracii metakroleina v vozduhe rabochej zony.

17 Tehnicheskie uslovija na metod opredelenija krotonovogo al'degida v vozduhe [jelektronnyj resurs: tochka dostupa http://www.libussr.ru/doc_ussr/usr_6652.htm]