

УДК 535.37:546.65:541.183

С. В. Бельтюкова, Е. В. МалинкаОдесская национальная академия пищевых технологий,
Канатная, 112, Одесса, 65039, Украина
e-mail: onahtan@yandex.ru**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАМАТА НАТРИЯ МЕТОДОМ
ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С
ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

Установлены оптимальные условия образования разнолигандного комплекса иона тербия (III) с ципрофлоксацином и глутаматом натрия, определены его спектрально-люминесцентные характеристики в фазе сорбента (максимумы длин волн люминесценции и возбуждения, время жизни люминесценции). Установлено, что в комплексе осуществляется эффективный перенос энергии возбуждения от лиганда к иону лантанида, что обуславливает интенсивную люминесценцию последнего. Выбраны оптимальные условия хроматографического выделения глутамата натрия: неподвижная и подвижная фаза, объём пробы, наносимой на пластинку, оптимальные концентрации проявляющих растворов – хлорида Tb(III), ципрофлоксацина, уротропина. Разработана методика определения глутамата натрия в сушёных кальмарах методом тонкослойной хроматографии с детектированием аналитического сигнала по сенсibilизированной люминесценции иона Tb(III) в фазе сорбента.

Ключевые слова: глутамат натрия, люминесценция, ион тербия (III).

Отличительная особенность современных пищевых технологий – использование пищевых добавок, которые выполняют технологические функции, улучшают органолептические характеристики пищевых продуктов и не всегда являются безопасными для здоровья человека. В Украине разрешён глутамат натрия в качестве пищевой добавки E621, усиливающей и модифицирующей вкус и аромат пищевых продуктов. При добавлении глутамата натрия в пищевые продукты (до 10г/кг) усиливаются их природные вкусовые свойства, ослабленные в процессе переработки и хранения, маскируются отдельные отрицательные составляющие вкуса и запаха. Обычно глутамат натрия используется для усиления вкуса и аромата в производстве сухих супов, бульонов, продуктов быстрого приготовления, чипсов, крекеров, соусов, майонезов, кетчупов, мясопродуктов, консервированных море- и рыбопродуктов в количестве от 0,1 до 0,5%.

Вред глутамата натрия при систематическом употреблении в больших количествах проявляется так называемым «синдромом китайского ресторана»: покраснением лица, шеи, области рта, учащенным сердцебиением, головной болью. Кроме того, установлено, что пищевая добавка E621 повреждает клетки мозга, повышает риски развития болезни Альцгеймера, а также вызывает наркотическое привыкание, в том числе и у детей, способствуя переяданию. Поскольку производитель, погнавшись за прибылью, активно добавляет усилитель вкуса – глутамат натрия в пищу, потребитель часто переходит на несбалансированную еду с избытком калорий, что сказывается как на его весе, так и на здоровье желудочно-кишечного тракта.

Для определения глутаминовой кислоты и её солей предложены различные методы анализа. Метод обращён – фазовой высокоэффективной жидкостной

хроматографии с получением фенилтиогидантоинов аминокислот [1] предусматривает кислотный гидролиз проб, модификацию аминокислот раствором фенилизотиацианата, хроматографирование на колонке и ультрафиолетовое детектирование при длине волны $\lambda = 254$ нм. Чувствительность определения глутаминовой кислоты – 1 мкг / мл. В работе [2] количественное определение глутамата натрия в пищевых продуктах основано на регистрации поглощения глутамата натрия, усиленного 1%-ным раствором нингидрина с постхроматографической дериватизацией, пятна сканируют с помощью денситометра в режиме оптической плотности при 485 нм, подвижность (R_f) составляет 0,64. Линейность наблюдается в диапазоне концентраций 0,4-1,0 мкг. В работе [3] предложен биосенсорный метод определения L-глутамата в жидких приправах с использованием L-глутамата оксидазы в комбинации с перекисью водорода. Реакция биосенсора линейно зависит от концентрации L-глутамата в пределах 0,001-1,0 ммоль/л. Время измерения составляет 2 мин. Авторы [4] определяли глутамат натрия с помощью капиллярного электрофореза и диод-индуцированной флуоресцентной детекции. При использовании дезактивированного капилляра, заполненного 0,6% – ным полиэтиленоксидом в 10 ммоль/л тетрабората (рН 9,3), предел обнаружения глутамата натрия составил 10-30 ммоль/л. В работах [5,6] описан метод тонкослойной хроматографии для обнаружения глутамата натрия (пластинки Silufol UV-254, элюент: н-бутанол : уксусная кислота: $H_2O=3:1:1$, $R_f = 0,31$, проявитель – 1% раствор нингидрина; УФ-лампа); результаты хроматографирования сравнивались с результатами хроматографирования глутамата натрия (образец сравнения) при облучении УФ-излучением, пробы в виде водных растворов готовили смывом дистиллированной водой с поверхности образцов.

В данной работе представлены результаты исследований по определению глутамата натрия методом тонкослойной хроматографии с люминесцентным детектированием. В качестве люминесцентного маркера использована сенсibilизированная люминесценция иона Tb(III) с ципрофлоксацином (ЦФ). В последние годы сенсibilизированная люминесценция ионов лантанидов в комплексах с органическими лигандами находит широкое применение для определения различных анионов как неорганической, так и органической природы, которые не являются сенсibilизаторами люминесценции лантанида, но могут увеличивать или тушить её интенсивность. Данный эффект использован для определения фосфатов [7], цитратов [8], малатов [9] и других анионов.

Аппаратура и техника эксперимента

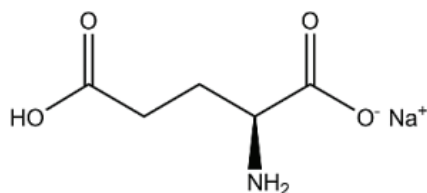
Раствор глутамата натрия (0,01 моль/л) готовили растворением точной навески препарата в водно-этанольном растворе (с объёмной долей этанола 50%), раствор ципрофлоксацина (0,01 моль/л) – растворением точной навески препарата в этаноле. Хлорид тербия готовили растворением высокочистого оксида (99,99%) в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением её избытка упариванием. Концентрацию Tb(III) контролировали комплексонометрическим титрованием раствором комплексона III (0,01 моль/л) с индикатором арсеназо I в присутствии уротропина.

Спектры люминесценции регистрировали с помощью спектрометра СДЛ-1 (ЛОМО). Люминесценцию возбуждали излучением ртутно-кварцевой лампы СВД-120А со светофильтром УФС-2. Для изучения кинетики затухания люминесценции применяли осциллографическую регистрацию. Люминесценцию возбуж-

дали при этом импульсным азотным лазером с длиной волны излучения 337 нм. Для хроматографирования использовали пластинки для ТСХ Silufol.

Результаты и их обсуждение

Глутамат натрия – моновалентная соль глутаминовой кислоты представляет собой белый кристаллический порошок, растворимый в воде:



При контакте с жидкостями соль диссоциирует на анионы глутамата и катионы натрия.

Ранее было показано, что ионы тербия Tb(III) образуют с производными хинолонкарбоновой кислоты, в частности, с ципрофлоксацином, ненасыщенные комплексные соединения, обладающие люминесцентными свойствами [10], интенсивность люминесценции ($I_{\text{люм}}$) которых значительно возрастает в присутствии поверхностно-активных веществ и донорно-активных добавок [11], что обусловлено образованием разнолигандных комплексов. В связи с этим можно было предположить, что и глутамат натрия будет вступать во взаимодействие с комплексом Tb(III) – ципрофлоксацин, образуя разнолигандный комплекс, что могло бы приводить к увеличению интенсивности люминесценции лантанида. Как показали результаты исследования в присутствии глутамата натрия $I_{\text{люм}}$ комплекса Tb(III) – ципрофлоксацин возрастает в несколько раз (рис. 1).

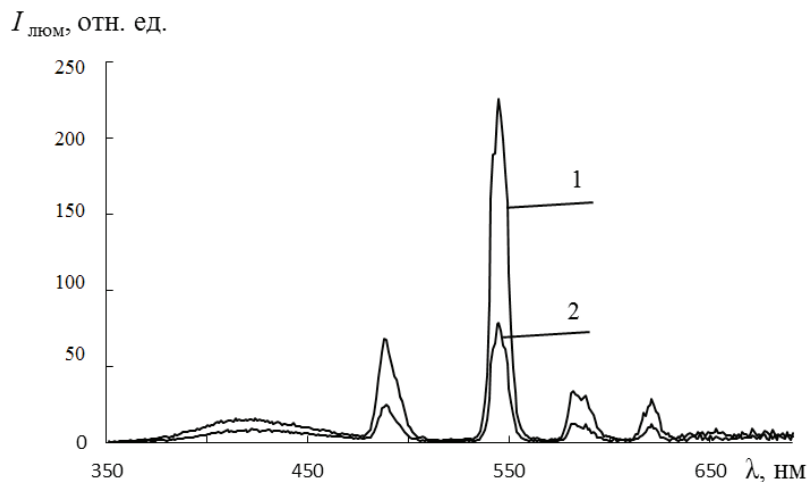


Рис. 1. – Спектр люминесценции сорбата комплекса Tb(III) – ЦФ в присутствии (1) и в отсутствие глутамата натрия (2)

В спектре возбуждения комплекса Tb(III) с ципрофлоксацином имеются 2 полосы с максимумами при 273 и 330 нм (рис.2). В присутствии глутамата натрия характер спектра не изменяется, но интенсивность полос возрастает, что свидетельствует о более эффективном переносе энергии возбуждения на ион лантанида.

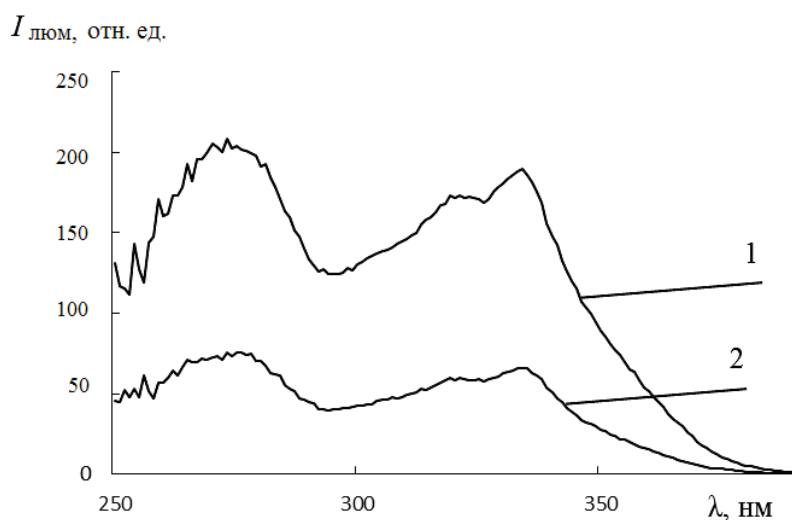


Рис. 2. – Спектр возбуждения сорбата комплекса Tb(III) – ЦФ в присутствии (1) и в отсутствие глутамата натрия (2)

Увеличение $I_{\text{люм}}$ спектров возбуждения и люминесценции можно объяснить тем, что глутамат натрия, также, как и лаурилсульфат [11], вытесняет молекулы воды из внутренней сферы комплекса Tb – ципрофлоксацин и образует разнолигандный комплекс. Подтверждением этого являются времена жизни, рассчитанные нами для двойного комплекса Tb (III) – ципрофлоксацин и разнолигандного с глутаматом натрия, которые составили 0,48 мс и 0,60 мс, соответственно. Кривые затухания люминесценции приведены на рис. 3. Присоединение второго лиганда приводит к возрастанию времени жизни люминесценции, что свидетельствует об уменьшении безызлучательной дезактивации энергии возбуждения.

Интенсивная люминесценция Tb(III) в разнолигандном комплексе с ципрофлоксацином и глутаматом натрия сохраняется на твердой матрице, в частности, в слое сорбента на хроматографической пластинке. С целью выбора оптимальных условий и режимов хроматографирования исследован ряд неподвижных фаз, различающихся по своим свойствам (Silufol, Sorbfil, СТХ-1А). Наилучшим оказалось применение хроматографических пластинок марки Silufol, на которых изображение пятен глутамата было более четким и пригодным для количественного анализа. В качестве оптимальной элюирующей системы выбрана система: этанол : вода = 7 : 3, подвижность глутамата натрия в этих условиях составляет 0,63. Изучение влияния объема пробы от 0,5 до 3 мкл, наносимого на пластинку, показало, что наилучший результат достигается при нанесении пробы объемом 2 мкл (рис.4). При меньших и больших количествах пятна на пластинке приобретают вытянутую форму.

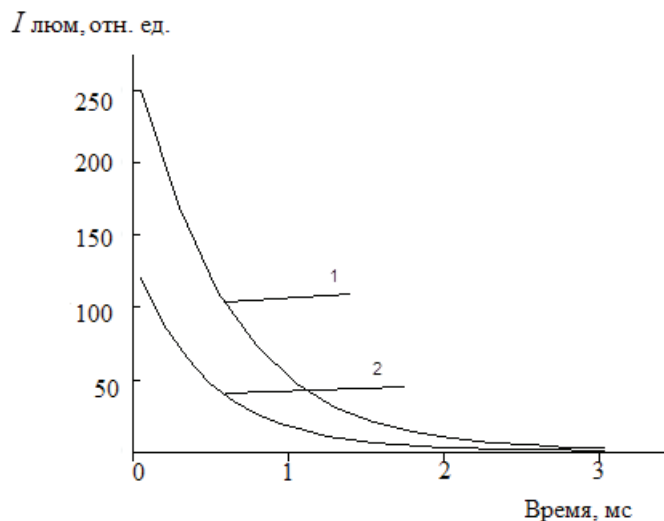


Рис. 3 – Кривые затухания люминесценции сорбата комплекса Tb(III) – ЦФ в присутствии (1) и в отсутствие глутамата натрия (2)

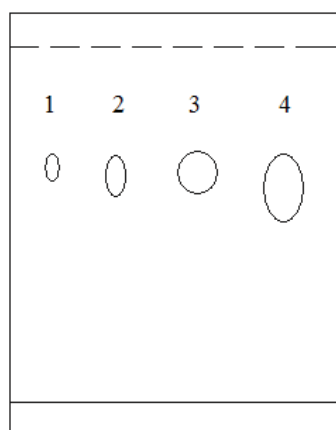


Рис. 4 – Влияние объёма пробы: 1) 0,5мкл; 2) 1мкл; 3) 2мкл; 4) 3мкл

Интенсивность люминесценции Tb(III) на хроматограмме зависит от концентрации иона лантанида в проявляющем растворе (табл. 1).

Таблица 1

Зависимость $I_{\text{люм}}$ сорбата комплекса от концентрации Tb(III) в проявляющем растворе

$C_{\text{Tb}} \times 10^{-4}$, моль/л	1	5	10	50
$I_{\text{люм}}$, отн. ед.	30	45	100	85

Наибольшая интенсивность люминесценции обнаруживается при использовании проявляющего раствора хлорида Tb(III) с молярной концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, в нейтральных растворах при pH 6,5 – 7,5, поэтому проявление пластинки проводят в присутствии раствора уротропина с массовой долей 4%. Максимальная $I_{\text{люм}}$ Tb в разнолигандном комплексе наблюдается при молярных концентрациях

ципрофлоксацина $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л и глутамата натрия – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Методом ограниченного логарифмирования установлено соотношение компонентов в комплексе Тб : ЦФ : ГН = 1:2:1.

На основании проведенных исследований разработана методика определения глутамата натрия в сушёных кальмарах, основанная на использовании люминесцентного сенсора Тб (III) – ципрофлоксацин с регистрацией аналитического сигнала на хроматографической пластинке.

Методика выполнения анализа: глутамат натрия экстрагировали из навески образца сушёных кальмаров (5 г) 5 мл дистиллированной воды в течение 1 часа при комнатной температуре. Пластинки Silufol активировали при 100°C в сушильном шкафу в течение 1 часа. Анализируемую пробу в количестве 2 мкл наносили шприцем на линию старта пластинки размером 40x80 мм, параллельно на пластинку наносили стандартный раствор глутамата натрия. В качестве стандартного использовали водно-этанольный раствор (с объёмной долей этанола 50 %) глутамата натрия ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Пластинку подсушивали и помещали в хроматографическую камеру с подвижной фазой. Когда фронт растворителя достигал высоты 70 мм, пластинку извлекали из камеры и отмечали положение фронта растворителя. Полученную хроматограмму высушивали и равномерно обрабатывали последовательно растворами проявителей — хлорида тербия ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), ЦФ ($2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и уротропина (4 %), после чего снова высушивали. Идентификацию глутамата натрия на пластинке проводили по появлению зеленой люминесценции иона Тб(III) при облучении УФ – светом, визуальную сравнивая $I_{\text{люм}}$ пробы и стандарта. Количественное определение глутамата натрия проводили по градуировочному графику.

Результаты определения глутамата натрия в 7 образцах сушёных кальмаров торговых марок «Беринг», «Премия» и «EUROGROUP» приведены в таблице 2. Точность и достоверность определения глутамата натрия проверена методом статистической обработки результатов анализа. При $n = 5$, $P = 0,95$ величина относительного стандартного отклонения S_r составляет (8,0–9,2) %.

Таблица 2

Результаты определения глутамата натрия в сушёных кальмарах ($n = 5$, $P = 0,95$)

№	Название товара	Торговая марка	Маркировка производителя	Содержание глутамата натрия (мг/г)	S_r , %
1	щупальца кальмара, полоски, солёно-сушёный	«EUROGROUP»	кальмар, соль, сахар, E621	$1,70 \pm 0,16$	9,2
2	кальмар, соломка, солёно-сушёный	«EUROGROUP»	кальмар, соль, сахар, E621	$1,92 \pm 0,16$	8,5
3	кальмар, соломка с перцем	«EUROGROUP»	кальмар, соль, сахар, E621, перец	$1,45 \pm 0,12$	8,0
4	кальмар копчёный	«EUROGROUP»	кальмар, соль, сахар, E621	$2,84 \pm 0,25$	8,7
5	филе кальмара с перцем	«EUROGROUP»	кальмар, соль, сахар, E621, перец	$2,55 \pm 0,21$	8,3
6	кальмар сушёный	«Беринг»	кальмар, соль, сахар	$3,39 \pm 0,29$	8,5
7	кальмар сушёно-солёный	«Премия»	кальмар сушёный, соль	$3,82 \pm 0,34$	9,0

Как видно из таблицы 2, во всех образцах найден глутамат натрия, однако не все производители указывают его наличие в продукте на этикетке, что классифицируется как фальсификация пищевого продукта.

Выводы: разработана простая и чувствительная методика определения глутамата натрия в сушёных кальмарах, основанная на сенсбилизации люминесценции иона тербия в разнолигандном комплексе Tb(III) – ципрофлоксацин – глутамат натрия на хроматографической пластинке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руденко А.А., Карцева Л.А. Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращённого-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т.10, № 2. – С. 223-230.
2. Krishna N., Karthika D, Surva M. Analysis of Monosodium l-Glutamate in Food Products by High-Performance Thin Layer Chromatography // J. Young Pharm. – 2010. – Vol. 2, N 3. – P. 297–300. <http://dx.doi.org/10.4103/0975-1483.66795>
3. Wollenberger U., Frieder W. A specific enzyme electrode for l-glutamate-development and application // Biosensors. – 1989. – Vol. 4, N 6. – P. 381–391. [http://dx.doi.org/10.1016/0265-928x\(89\)80004-5](http://dx.doi.org/10.1016/0265-928x(89)80004-5)
4. Lu M.-J., Chiu T.-C., Chang P.-L., Ho H.-T., Chang H.-T. Determination of glycine, glutamine, glutamate, and γ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluids by capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection // *Analyt. Chim. Acta.* – 2005. – Vol. 538, N 1–2. – P. 143–150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.041>
5. *Хроматография в тонких слоях* / Под ред. Э. Шталя. – М.: Мир. – 1965. – 508 с.
6. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. – Т.2. – М.: Мир. – 1981. – 616 с.
7. Duerkop A., Turel M., Lobnik A., Wolfbeis O.S. Microtiter plate assay for phosphate using a europium-tetracycline complex as a sensitive luminescent probe // *Analyt. Chim. Acta.* – 2006. – Vol. 555. – P. 292-298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.007>
8. Yegorova A., Vityukova E., Belyukova S., Duerkop A. Determination of citrate in tablets and of oxytetracycline in serum using europium (III) luminescence // *Microchem. J.* – 2006. – Vol. 83, N 3. – P. 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2005.12.005>
9. Lin Z., Wu M., Wolfbeis O.S. Time-resolved fluorescent chirality sensing and imaging of malate in aqueous solution // *Chirality.* – 2005. – Vol. 17, N 8. – P. 464-469. <http://dx.doi.org/10.1002/chir.20185>
10. Бельтюкова С.В., Егорова А.В., Теслик О.И. Использование f-f люминесценции ионов Eu(III), Tb(III) в анализе лекарственных препаратов // *Укр. хим. журнал.* – 2000. – Т. 66, № 10. – С. 115-121.
11. Belyukova S., Egorova A., Tselik E. Solid-phase luminescence determination of ciprofloxacin and norfloxacin in biological fluids // *J. Fluorescence.* – 2002. – Vol. 12, N 2. – P. 269–272. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016833422299>.

Стаття надійшла до редакції 02.07.15

С. В. Бельтюкова, О. В. Малинка

Одеська національна академія харчових технологій, кафедра харчової хімії
вул. Канатна, 112, Одеса, 65039, Україна; e-mail: onahtan@yandex.ru

ВИЗНАЧЕННЯ ГЛУТАМАТА НАТРІЮ МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З ЛЮМІНЕСЦЕНТНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ

Встановлені оптимальні умови утворення різнолігандного комплексу іону тербію (III) з ципрофлоксацином і глутаматом натрію, визначені його спектрально-люмінесцентні характеристики у фазі сорбенту (максимуми довжин хвиль люмінесценції та збудження люмінесценції, час життя люмінесценції). Встановлено, що в комплексі здійснюється ефективно перенесення енергії збудження від ліганду до іону лантаніду, що обумовлює

інтенсивну люмінесценцію останнього. Вибрані оптимальні умови хроматографічного виділення глутамату натрію: нерухома і рухома фази, об'єм проби, що наноситься на платівку, оптимальні концентрації проявників – хлориду Tb(III), ципрофлоксацину, уротропіну.

Розроблена методика визначення глутамату натрію в сушених кальмарах методом тонкошарової хроматографії з детектуванням аналітичного сигналу по сенсibilізованій люмінесценції іону Tb(III) у фазі сорбенту.

Ключові слова: глутамат натрію, люмінесценція, іон тербію (III).

S. V. Beltyukova, E. V. Malynka

Odessa National Academy of Food Technologies,

Kanatnaya st., 112, Odessa, Ukraine, 65039; e-mail: onahtan@yandex.ru

DETERMINATION OF SODIUM GLUTAMATE BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY METHOD WITH LUMINESCENT DETECTION

The spectral and luminescent properties of Tb(III) complex with ciprofloxacin and monosodium glutamate (MSG) were studied. The stoichiometric composition of complex (Tb(III) : ciprofloxacin : MSG = 1:2:1) was determined by the Bent-French method. Its spectral and luminescent characteristics in the phase of sorbent (the maximum wavelength of the luminescence and luminescence excitation, the lifetime of luminescence) were defined. It was established that effective energy transfer takes place from the ligand excited state to lanthanide ion in Tb(III) – ciprofloxacin – MSG complex resulting in intensive sensitized luminescence.

The optimal conditions of chromatographic separation of monosodium glutamate (stationary and mobile phase, the sample volume applied to the plate, the optimal concentration of a luminescent detection reagent (Tb(III), ciprofloxacin, MSG) were selected. The maximal luminescence intensity was occurred at $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L Tb (III) in neutral solutions at pH 6,5 – 7,5. The maximal luminescence intensity of Tb(III) – ciprofloxacin – MSG complex was observed at $2 \cdot 10^{-3}$ mol/L ciprofloxacin and at $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L MSG.

A thin layer chromatography method for determining of monosodium glutamate in dried squids with using Tb (III) – ciprofloxacin as a fluorescent detection reagent has been proposed. Sodium glutamate was found in all commercial samples of dried squid. This means that some manufacturers do not indicate the presence of this food additive on the label of the products in the ingredient list in any packaged food in contrast of food labeling law.

Key words: monosodium glutamate, luminescence, terbium (III) ion.

REFERENCES

1. Rudenko A.A., Kartseva L.A. *Opređenje vazhneyshih aminokislót v slozhnyih ob'ektah biologicheskogo proishozhdeniya metodom obraschyonnogo-fazovoy VEZhH s polucheniem feniltogidantoinov aminokislót. Sorbtionnyie i hromatograficheskie protsessyi*, 2010, vol. 10, no. 2, pp. 223-230 (in Russian).
2. Krisha N., Karthika D, Surva M. *Analysis of Monosodium L-Glutamate in Food Products by High-Performance Thin Layer Chromatography*. J. Young Pharm., 2010, vol. 2, no. 3, pp. 297–300. <http://dx.doi.org/10.4103/0975-1483.66795>
3. Wollenberger U., Frieder W. *A Specific enzyme electrode for L-glutamate-development and application*. Biosensors, 1989, vol. 4, no 6, pp. 381–391. [http://dx.doi.org/10.1016/0265-928x\(89\)80004-5](http://dx.doi.org/10.1016/0265-928x(89)80004-5)
4. Lu M.-J., Chiu T.-C., Chang P.-L., Ho H.-T., Chang H.-T. *Determination of glycine, glutamine, glutamate, and γ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluids by capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection*. *Analyt. Chim. Acta*, 2005, vol. 538, no 1–2, pp. 143–150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.041>

5. *Hromatografiya v tonkih sloyah*. Pod red. Shtal E. M: Mir, 1965, 508 p. (in Russian)
6. Kirhner Yu. *Tonkosloynaya hromatografiya* vol. 2, M: Mir, 1981, 616 p. (in Russian)
7. Duerkop A., Turel M., Lobnik A., Wolfbeis O.S. *Microtiter plate assay for phosphate using a europium-tetracycline complex as a sensitive luminescent probe*. *Analyt. Chim. Acta*, 2006, vol. 555, pp. 292-298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.007>
8. Yegorova A., Vityukova E., Beltyukova S., Duerkop A. *Determination of citrate in tablets and of oxytetracycline in serum using europium (III) luminescence*. *Microchem. J.*, 2006, vol. 83, no. 3. pp. 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2005.12.005>.
9. Lin Z., Wu M., Wolfbeis O.S. *Time-resolved fluorescent chirality sensing and imaging of malate in aqueous solution*. *Chirality*, 2005, vol. 17, no. 8. pp. 464-469. <http://dx.doi.org/10.1002/chir.20185>
10. Beltyukova S.V., Egorova A.V., Teslyuk O.I. *Ispolzovanie f-f lyuminescentsii ionov Eu(III), Tb(III) v analize lekarstvennykh preparatov*. *Ukr. Him. Zhurnal*, 2000, vol. 66, no. 10, pp. 115-121. (in Russian)
11. Beltyukova S. Egorova A., Teslyuk O. *Solid-phase luminescence determination of ciprofloxacin and norfloxacin in biological fluids*. *J. Fluorescence*, 2002, vol. 12, no 2, pp. 269-272. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016833422299>.