

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОДОВОЛЬСТВЕННЫХ ПРОДУКТОВ

TECHNOLOGY OF FOOD PRODUCTION

<https://doi.org/10.47370/2072-0920-2022-18-4-17-25>

УДК 635.44:547.496.1

© 2022

Поступила 01.12.2022

Received 01.12.2022



Принята в печать 26.12.2022

Accepted 26.12.2022

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interests

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ / ORIGINAL ARTICLE

АДАПТАЦИЯ МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИНИГРИНА В СЕМЕНАХ ГОРЧИЦЫ

Наталья В. Алпатова^{1*}, Мария И. Елецкая¹,
Галина Г. Русакова², Дмитрий В. Парахневич³

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный технологический университет»;
ул. Московская, д. 2, г. Краснодар, 350072, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный технический университет»;
проспект им. В.И. Ленина, д. 28, г. Волгоград, 400005, Российская Федерация

³ ООО «Волгоградский горчичный маслозавод «Сарепта»;
ул. Бахтурова, д. 2, г. Волгоград, 400031, Российская Федерация

Б л а г о д а р н о с т ь

Исследования выполнены в рамках госзадания Минобрнауки РФ,
проект № FZEZ-2020-0004.

Аннотация. Работа посвящена исследованиям по адаптации, верификации и внедрению метода определения синигрина в семенах горчицы и продуктах ее переработки, а также в других видах продовольственного сырья растительного происхождения. Актуальность исследований определяется с одной стороны необходимостью контроля синигрина в технологических процессах переработки горчицы, а с другой – отсутствием эффективных стандартизированных методов определения синигрина в РФ.

Целью исследований является модификация и(или) адаптация наиболее эффективных методик идентификации и количественного определения синигрина, представленных в

публикациях зарубежных исследователей. Задачи исследования включали: построение градуировочных графиков; модификацию методики подготовки пробы для снижения трудоемкости и длительности анализа при сохранении требуемых параметров точности и воспроизводимости; адаптацию метода проведения анализа с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии; верификацию и проведение апробации предлагаемого метода с использованием реальных производственных образцов – семян горчицы.

В качестве базового метода использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В результате проведенных исследований модифицирована методика пробоподготовки, что позволило снизить трудоемкость и сократить время на ее проведение при сохранении требуемых метрологических характеристик. Определена калибровочная зависимость и предложен метод идентификации и количественного анализа синигрина в сырье растительного происхождения с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа, оснащенного диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами. В результате верификации определены метрологические характеристики предлагаемого метода: диапазон измерений от 0,0005 до 10%, показатель точности $\pm 0,01\%$.

Метод апробирован на реальных объектах – семенах горчицы, являющихся основным источником синигрина. Предлагаемый метод идентификации и количественного определения синигрина может быть рекомендован для использования в исследовательских и производственных лабораториях, оснащенных необходимыми средствами измерения и испытательным оборудованием.

Ключевые слова: синигрин, глюкозинолаты, семена горчицы, идентификация синигрина, количественный анализ синигрина, высокоэффективная жидкостная хроматография, адаптация и модификация метода анализа, верификация

Для цитирования: Адаптация метода идентификации и количественного определения синигрина в семенах горчицы / Алпатова Н.В. [и др.] // Новые технологии. 2022. Т. 18, № 4. С. 17-25. <https://doi.org/10.47370/2072-0920-2022-18-4-17-25>

ADAPTATION OF THE METHOD FOR IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF SINIGRIN IN MUSTARD SEEDS

Natalia V. Alpatova^{1*}, Maria I. Eletskaia¹,
Galina G. Rusakova², Dmitry V. Parakhnevich³

¹FSBEI HE «Kuban State Technological University»;
2 Moscovskaya str., Krasnodar, 350072, the Russian Federation

²FSBEI HE «Volgograd State Technical University»;
28 V.I. Lenin avenue, Volgograd, 400005, the Russian Federation

³LLC «Volgograd mustard oil plant "Sarepta"»;
2 Bakhturov str., Volgograd, 400031, the Russian Federation

Acknowledgments

The research was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, project No. FZEZ-2020-0004.

Abstract. The research is devoted to the study on adaptation, verification and implementation of the method for determining sinigrin in mustard seeds and products of its processing, as well as in other types of food raw materials of plant origin. The relevance of the research is determined, on the one hand,

by the need to control sinigrin in the technological processes of mustard processing, and, on the other hand, by the lack of effective standardized methods for determining sinigrin in the Russian Federation.

The aim of the research is to modify and (or) adapt the most effective methods for the identification and quantification of sinigrin, presented in the publications of foreign researchers. The objectives of the study included construction of calibration graphs; modification of the sample preparation technique to reduce the complexity and duration of the analysis while maintaining the required parameters of accuracy and reproducibility; adaptation of the analysis method using high performance liquid chromatography; verification and approbation of the proposed method using real production samples, i.e. mustard seeds.

High performance liquid chromatography has been used as the basic method.

As a result of the research, the sample preparation technique has been modified. It has made it possible to reduce labor intensity and reduce the time for its implementation while maintaining the required metrological characteristics. The calibration dependence has been determined and a method for the identification and quantitative analysis of sinigrin in raw materials of plant origin using a high-performance liquid chromatograph equipped with a diode array and mass spectrometric detectors proposed. As a result of verification, the metrological characteristics of the proposed method have been determined: the measurement range is from 0.0005 to 10%, the accuracy index is $\pm 0.01\%$.

The method has been tested on real objects, mustard seeds, which are the main sources of sinigrin. The proposed method for the identification and quantification of sinigrin can be recommended for use in research and production laboratories equipped with the necessary measuring instruments and testing equipment.

Keywords: sinigrin, glucosinolates, mustard seeds, sinigrin identification, sinigrin quantitative analysis, high performance liquid chromatography, analysis method adaptation and modification, verification

For citation: *Adaptation of the method for identification and quantification of sinigrin in mustard seeds / Alpatova N.V. [et al.] // New technologies. 2022. V. 18, No. 4. P. 17-25. <https://doi.org/10.47370/2072-0920-2022-18-4-17-25>*

Введение. Синигрин – сложное органическое вещество, представитель класса глюкозинолатов, который содержится в отдельных видах растений семейства Brassicaceae, таких как брокколи, брюссельская капуста, горчица, рапс, хрен и других. Одним из перспективных источников получения синигрина в качестве самостоятельного продукта являются семена черной и сарептской горчицы, где его содержание достигает 4% [1].

В чистом виде синигрин представляет собой твердое кристаллическое вещество белого цвета с молекулярной массой 358 и температурой плавления 125–127°C. Легко растворяется в воде, ограниченно – в этаноле и практически не растворяется в неполярных органических растворителях [2].

Согласно химической формуле $C_{10}H_{16}KNO_9S_2$, синигрин является

О-тиогликозидом, структурная формула молекулы представлена на рис. 1.

Как известно, гликозиды являются продуктами реакции между спиртами и сахарами в полуацетальной форме [3, с. 93]. Синигрин в нативной форме считается антипитательным веществом [4, с. 75; 5 с. 11; 6, с. 241]. Однако биологически активные свойства синигрина определяют широкий спектр его функциональных свойств. В результате гидролиза синигрин превращается в аллилизотиоцианат, обладающий антимикробными, противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами [7; 8].

Под влиянием фермента мирозиназы синигрин в присутствии водной среды распадается на глюкозу, серно-калиевую соль и изороданистый аллил – основную составляющую горчичного эфирного масла. Эфирное горчичное масло

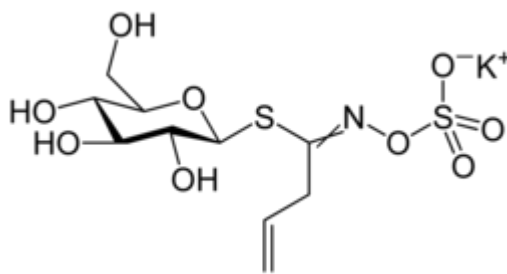


Рис. 1. Структурная формула синигрина

Fig. 1. Structural formula of sinigrin

вызывает раздражение слизистых оболочек организма, что может спровоцировать развитие воспалительного процесса [6, с. 241].

В настоящее время проводятся исследования по разработке эффективного способа удаления синигрина из продуктов переработки семян горчицы, а также отдельных сортов рапса с выделением его в качестве самостоятельного вторичного продукта [4; 6; 9]. Решение данной задачи предполагает осуществление идентификации и контроля содержания синигрина как в исходном сырье, так и в продуктах переработки.

Однако, как показал анализ научной литературы, эффективные стандартизированные методы идентификации и количественного определения синигрина в настоящее время отсутствуют в РФ.

Большинство современных методов, используемых за рубежом, для количественного определения синигрина основаны на применении высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [10–12].

Таким образом, актуальной является модификация и(или) адаптация наиболее эффективных методик идентификации и количественного определения синигрина, представленных в публикациях зарубежных исследователей.

В соответствии с поставленной целью решали следующие задачи:

- построение градуировочного графика и получение калибровочной зависимости;
- модификация методики подготовки пробы;

– адаптация метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для идентификации и количественного определения синигрина;

– проведение верификации и апробации предлагаемого метода на производственных образцах семян горчицы.

Объекты и методы исследований.

В качестве основного объекта исследований использовали семена горчицы и горчичный порошок.

В качестве стандартного образца синигрина использовали SINIGRIN HYDRATE, приобретенный у фирмы Sigma-Aldrich, содержание синигрина более 99% (CAS 3952-98-5).

Хроматографический анализ осуществляли с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа «Agilent 1260 Infinity», оснащенного диодно-матричным детектором и масс-детектором «Agilent 6120», на колонке LiChrospher Si 60 (силикагель 60 (5 мкм) для колоночной хроматографии длиной 250 мм, диаметром 4 мм) при длине волны 234 нм.

Условия хроматографирования:

- подвижная фаза ацетонитрил:вода в соотношении 95:5 (используется бидистиллированная вода ($R \geq 18$ МОм);
- скорость потока элюента 0,8 мл/мин;
- объем вводимой пробы 1 мкл;
- температура хроматографирования $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- длина волны детектирования 234 нм.

Обработка результатов осуществлялась с использованием программного

обеспечения OpenLAB-Chem station от Agilent.

Исследования проводились на оборудовании ЦКП «Исследовательский центр пищевых и химических технологий» ФГБОУ ВО «Кубанский государственный технологический университет» (СКР_3111), развитие которого осуществляется при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2021-679).

Результаты исследований и их обсуждение

При разработке метода в качестве базовых были выбраны методики, описанные в статьях зарубежных исследователей [10–13].

На первом этапе исследования строили градуировочный график с использованием стандартного образца синигрина.

Приготовление основного раствора включало растворение стандартного образца синигрина в бидистиллированной воде с получением раствора концентрацией 2100 ppm или 5,28 мкМоль/г. Из основного раствора синигрина методом разбавления готовили рабочие калибровочные растворы концентраций 42 ppm и 21 ppm.

Градуировочный график представлен на рис. 2.

Массовую долю синигрина, мкг/г (ppm или мг/кг), определяли по формуле:

$$\rho = \frac{As * C * V * Vst}{Ast * m * Vs}, \quad (1)$$

где As – площадь или высота пика синигрина в растворе пробы;

Ast – площадь или высота пика синигрина в градуировочном растворе;

V – общий объем раствора пробы, мл;

C – массовая концентрация синигрина в градуировочном растворе, мкг/мл;

m – масса пробы, г;

Vst – объем инъекции градуировочного раствора, мкл;

Vs – объем инъекции раствора пробы, мкл.

На втором этапе исследований нами был модифицирован метод пробоподготовки, описанный в зарубежной статье «Определение синигрина, sinalбина, аллил- и бензил-изотиоцианатов методом RP-HPLC в экстрактах горчичного порошка» [10].

На основании проведенных исследований нами было подобрано количество пробы, ее соотношение с экстрагентом, в качестве которого использовалась дистиллированная вода, температура и длительность экстракции. Такая модификация позволила упростить пробоподготовку, сократить время на ее

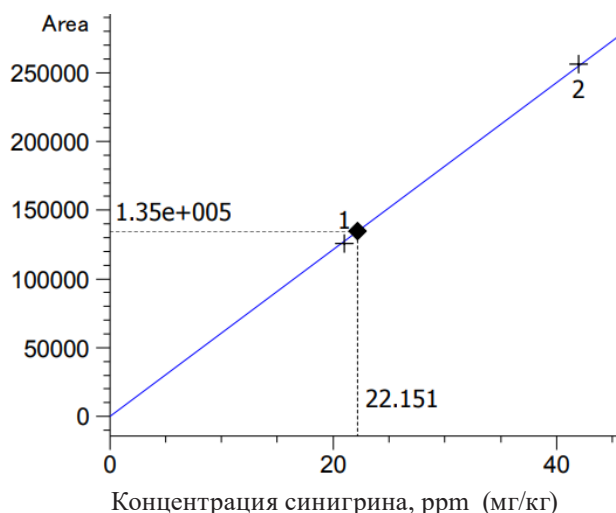


Рис. 2. Зависимость площади пика от концентрации синигрина

Fig. 2. Dependence of peak area on sinigrin concentration

проведение при сохранении требуемых метрологических характеристик.

Предлагаемая нами методика пробоподготовки состояла в следующем. Навеска семян в количестве 1 г помещалась в термостойкий стакан, объемом 25 см³, куда добавлялось 15 см³ дистиллированной воды, после чего навеску в целях размягчения семян и инактивации ферментов нагревали на водяной бане в течение 10 мин при температуре 90±2 °С. После этого полученную массу количественно переносили в фарфоровую ступку и растирали в течение 2 мин.

Содержимое ступки количественно переносили в стакан объемом 100 см³, ступку несколько раз промывали водой в таком количестве, чтобы общий ее объем в стакане составлял 100 мл. Стакан с раствором помещали на ультразвуковую баню Ultrasonic Cleaner на 5 минут при температуре 23±2 °С. После отстаивания в течение 20 минут, небольшое количество верхнего слоя фильтровали через шприцевый фильтр с размером пор 0,45 мкм. Полученный фильтрат в объеме 1 мкл, что в несколько раз меньше чем необходимо при использовании оборудования, предложенного в исходной методике, переносили в вials и проводили хроматографический анализ.

На рис. 3 для примера представлена хроматограмма, полученная при определении синигрина в образце семян сарептской горчицы. Показано, что предлагаемый метод позволяет получить однозначно идентифицируемый, хорошо разрешенный пик синигрина.

На следующем этапе исследований была проведена верификация и определены основные метрологические характеристики метода.

При планировании эксперимента выбор количества контрольных процедур (результатов анализа) был осуществлен в соответствии с РМГ 61-2010 [14].

Экспериментальные данные получали при вариации всех учтенных факторов, формирующих внутрилабораторную прецизионность, включающих время проведения эксперимента, оператора, набор реактивов и лабораторной посуды.

Учитывая, что градуировочный график линейен во всем диапазоне измерений, для оценки метрологических характеристик использовали одну стабильную однородную рабочую пробу. В качестве рабочей пробы были использованы семена горчицы.

Полученные метрологические характеристики предлагаемого метода идентификации и количественного определения синигрина представлены в таблице 1.

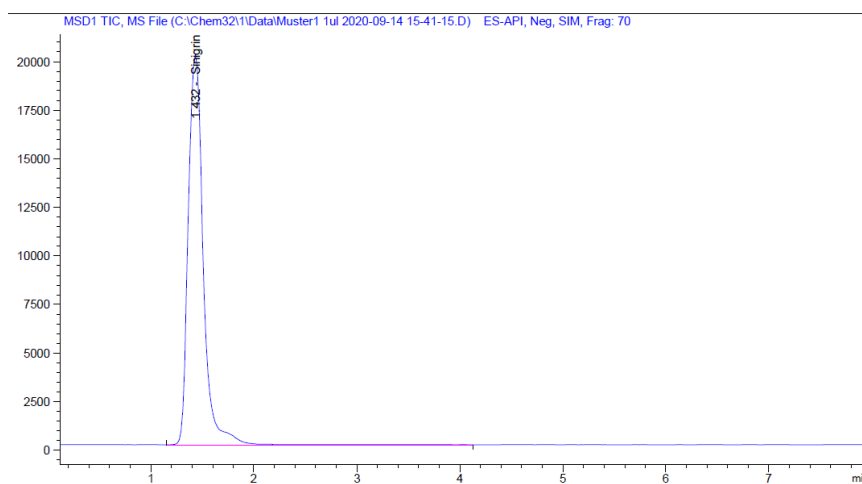


Рис. 3. Хроматограмма, полученная при определении синигрина в образце семян горчицы

Fig. 3. Chromatogram obtained from the determination of sinigrin in a mustard seed sample

Таблица 1

Метрологические характеристики модифицированного метода определения синигрина

Table 1

Metrological characteristics of the modified method for the determination of sinigrin

Диапазон измерений, %	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r , %	Предел повторяемости, r , % отн	Стандартное отклонение воспроизводимости, σ_R , %	Предел воспроизводимости, R , % отн	Показатель точности, $\pm\Delta$, %	Расширенная неопределенность, %
0,0005–10,0	0,01	0,03	0,006	0,02	0,01	5,16

Проведенные исследования показали, что предлагаемый метод позволяет определять синигрин в диапазоне концентраций от 0,0005 до 10% с погрешностью не более $\pm 0,01\%$.

Апробация предлагаемого метода проводилась на производственных образцах семян горчицы. Методика применялась без внесения корректировок. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Полученные данные согласуются с литературными данными [11–13] и свидетельствуют о возможности успешного применения адаптированной методики для анализа содержания синигрина в семенах растений семейства крестоцветных и пищевых ингредиентах на их основе.

Учитывая достаточную простоту и доступность предлагаемого метода, он может быть внедрен в практику не только

Таблица 2

Результаты определения синигрина в семенах горчицы

Table 2

The results of the determination of sinigrin in mustard seeds

Обозначение образца	Содержание синигрина, %
Образец 1	3,67
Образец 2	4,13
Образец 3	3,71
Образец 4	3,27
Образец 5	3,94

исследовательских, но и производственных лабораторий для определения содержания синигрина в продовольственном сырье – семенах горчицы, рапса, продуктах их переработки, а также в частях растений семейства крестоцветных.

Выводы. В результате проведенного исследования предложен метод идентификации и количественного определения синигрина в семенах горчицы и продуктах ее переработки с использованием высокоэффективного

жидкостного хроматографа, оснащенного диодно-матричным детектором и масс-спектрометрическим детектором. Метод обеспечивает предел обнаружения синигрина, составляющий 0,0005%, абсолютная погрешность не превышает 0,01%. Метод может быть рекомендован для использования в исследовательских и производственных лабораториях, оснащенных необходимым измерительным и испытательным оборудованием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Скурихин И.М., Нечаев А.П. Все о пище с точки зрения химика: справочное издание. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
2. Новый справочник химика и технолога / под ред. Г.М. Островского. М.: Профессионал, 2007.
3. Дамодаран Ш., Паркин К.Л., Феннема О.Р. Химия пищевых продуктов / пер. с англ. СПб.: Профессия, 2012. 1040 с.
4. Извлечение синигрина из продуктов переработки семян горчицы / Г. Русакова [и др.] // Комбикорма. 2012. № 6. С. 75–76.
5. Обзор по биохимическим и физиологическим свойствам семян горчицы / П.П. Демченко [и др.] // Отчет о НИР. Л.: ВНИИЖ, 1992. С. 2–29.
6. Определение параметров экстракции синигрина из семян горчицы планированием эксперимента / Г.Г. Русакова [и др.] // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса. Наука и высшее профессиональное образование. 2016. № 1 (41). С. 240–249.
7. Ramesh C. Gupta, Rajiv Lall, Ajay Srivastava/Nutraceuticals (Second Edition). Academic Press. 2021: 1321–1363.
8. Fofaria Neel M. Mechanisms of the Anticancer Effects of Isothiocyanates. The Enzymes. 2015; 37: 111–137.
9. Новая технология переработки семян горчицы: монография / Г.Г. Русакова [и др.]. Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2015. 140 с.
10. Herzallah S., Holley R. Determination of sinigrin, sinalbin, allyl-and benzyl isothiocyanates by RP-HPLC in mustard powder extracts. LWT-Food Science and Technology. 2012; 47: 293–299.
11. Lin Tsai-Hung, Huang, Jenn-Wen, Kumar Ponnusamy Vinoth [et al.] Determination of Sinigrin in Vegetable Seeds by Online Microdialysis Sampling Coupled to Reverse-Phase Ion-Pair Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010; 58(8): 4571–4575.
12. Rangkadilok Nuchanart N., Bennett M., Premier R. [et al.] Determination of sinigrin and glucoraphanin in Brassica species using a simple extraction method combined with ion-pair HPLC analysis. Scientia Horticulturae. 2010; 96: 27–41.
13. Herzallah S., Holley R. Determination of sinigrin, sinalbin, allyl-and benzyl isothiocyanates by RP-HPLC in mustard powder extracts. LWT-Food Science and Technology. 2012; 47: 293–299.
14. ПМГ 61-2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: Стандартинформ, 2013. 59 с.

REFERENCES:

1. Skurikhin I.M., Nechaev A.P. All about food from the point of view of a chemist: a reference book. M.: Higher school, 1991. (In Russ.)
2. New handbook of a chemist and a technologist / ed. by G.M. Ostrovsky. M.: Professional, 2007. (In Russ.)
3. Damodaran Sh., Parkin K.L., Fennema O.R. Chemistry of foodstuffs / transl. from English. St. Petersburg: Profession, 2012. (In Russ.)
4. Rusakova G. [et al.] Extraction of sinigrin from mustard seed processing products. Compound feed. 2012; 6: 75–76. (In Russ.)
5. Demchenko P.P. [et al.] Review on the biochemical and physiological properties of mustard seeds. Research report. L.: VNIIZh, 1992. (In Russ.)
6. Rusakova G.G. [et al.] Determining the parameters of extraction of sinigrin from mustard seeds by planning an experiment. Proceedings of the Nizhnevolzhsky agrouniversity complex. Science and higher professional education. 2016; 1(41): 240–249. (In Russ.)

7. Ramesh C. Gupta, Rajiv Lall, Ajay Srivastava/Nutraceuticals (Second Edition). Academic Press. 2021: 1321–1363.
8. Fofaria Neel M. Mechanisms of the Anticancer Effects of Isothiocyanates. The Enzymes. 2015; 37:111–137.
9. Rusakova G.G. [et al.] New technology for processing mustard seeds: monograph. Volgograd: Volgograd State Agrarian University, 2015. (In Russ.)
10. Herzallah S., Holley R. Determination of sinigrin, sinalbin, allyl-and benzyl isothiocyanates by RP-HPLC in mustard powder extracts. LWT-Food Science and Technology. 2012; 47: 293–299.
11. Lin Tsai-Hung, Huang, Jenn-Wen, Kumar Ponnusamy Vinoth [et al.] Determination of Sinigrin in Vegetable Seeds by Online Microdialysis Sampling Coupled to Reverse-Phase Ion-Pair Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010; 58(8): 4571–4575.
12. Rangkadilok Nuchanart N., Bennett M., Premier R. [et al.] Determination of sinigrin and glucoraphanin in Brassica species using a simple extraction method combined with ion-pair HPLC analysis. Scientia Horticulturae. 2010; 96: 27–41.
13. Herzallah S., Holley R. Determination of sinigrin, sinalbin, allyl-and benzyl isothiocyanates by RP-HPLC in mustard powder extracts. LWT-Food Science and Technology. 2012; 47:293–299.
14. RMG 61-2010 State system for ensuring the uniformity of measurements. Indicators of accuracy, correctness of precision of methods of quantitative chemical analysis. Assessment methods. M.: Standartinform, 2013. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Наталья Владимировна Алпатова, младший научный сотрудник Испытательного центра ФГБОУ ВО «Кубанский государственный технологический университет»

ktgr11@mail.ru

Мария Ивановна Елецкая, лаборант-исследователь Испытательного центра ФГБОУ ВО «Кубанский государственный технологический университет»

ktgr11@mail.ru

Галина Георгиевна Русакова, профессор кафедры промэкологии и БЖД ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный технический университет», доктор сельскохозяйственных наук

Дмитрий Валерьевич Парахневич, заместитель директора по производству ООО «Волгоградский горчичный маслозавод "Сарепта"», кандидат технических наук

Natalia Vladimirovna Alpatova, a junior researcher of the Testing Center of FSBEI HE «Kuban State Technological University»

ktgr11@mail.ru

Maria Ivanovna Eletskaia, a research laboratory assistant of the Testing Center FSBEI HE «Kuban State Technological University»

ktgr11@mail.ru

Galina Georgievna Rusakova, a professor of the Department of Promecology and SOL, FSBEI HE «Volgograd State Technical University», Doctor of Agricultural Sciences

Dmitry Valeryevich Parakhnevich, a deputy director for production of LLC «Volgograd Mustard Oil Plant "Sarepta"», Candidate of Technical Sciences