

УДК 543.544.5.068.7:543.51

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ 17 СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ/КВАДРУПОЛЬ-ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

© В. Г. Амелин^{1,2}, Д. С. Большаков²

Статья поступила 8 июля 2016 г.

Предложен простой способ пробоподготовки, быстрого скрининга и определения 17 красителей, маркированные индексом E, в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения. Пробо-подготовка твердых образцов включала твердофазно-жидкостную экстракцию ацетонитрилом, разбавление экстракта в два раза деионированной водой, фильтрование и хроматографирование, для напитков — центрифугирование, разбавление в 10 раз, фильтрование и хроматографирование. Пределы определения составили 0,1 – 300 нг/г. Предложена схема скрининга и определения красителей в пищевых продуктах, включающая идентификацию красителей по точной массе иона (m/z), времени удерживания и совпадению изотопного распределения $mSigma$, а также определение красителей методом стандартной добавки в случае их обнаружения. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 0,1. Продолжительность анализа составляла 0,5 – 1 ч.

Ключевые слова: синтетические красители; пищевые продукты; высокоэффективная жидкостная хроматография; времяпролетная масс-спектрометрия высокого разрешения.

Натуральные и синтетические красители используют в пищевой промышленности для придания цвета и улучшения внешнего вида различных продуктов — напитков, пряностей, специй, мяса, морепродуктов и др. Натуральные пищевые красители получают из растений, животных и микроорганизмов. Пищевые продукты, содержащие натуральные красители, считаются безопасными для здоровья. Синтетические пищевые красители (E 100 – E 200) получают химическим путем, и часто они не имеют природных аналогов, однако такие красители пользуются большей популяр-

ностью: они дешевле, дольше хранятся и имеют более яркие цвета.

В настоящее время установлено негативное влияние на организм человека некоторых красителей, вызывающих аллергические реакции, заболевания желудочно-кишечного тракта, в том числе и онкологические. Так, в ряде стран запрещено использование таких красителей, как цитрусовый красный (E 121), коричневый FK (E 154), кармин 6B (E 180) и др. [1].

Существующие методики идентификации и определения синтетических красителей основаны на использовании метода капиллярного электрофореза (КЭ), тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различными детекторами, в том числе масс-спектрометрическим.

¹ Владимирский государственный университет им. А. Г. и Н. Г. Столетовых, г. Владимир, Россия; e-mail: amelinvg@mail.ru

² Федеральный центр охраны здоровья животных, г. Владимир, Россия.

В Российской Федерации в качестве стандартизированного метода определения красителей наиболее часто используют метод ТСХ [2 – 5]. Методики охватывают широкий круг объектов анализа, в число которых входят пряности, мясо, вино, карамель и замороженные десерты, недостаток методик — сложная пробоподготовка, требующая проведения нескольких стадий очистки экстракта и использования токсичных растворителей.

Наиболее перспективными и быстроразвивающимися методами идентификации и определения синтетических красителей являются методы КЭ [5 – 9] и ВЭЖХ с различными вариантами детектирования [10, 11]. Несмотря на простоту аппаратного оформления метода КЭ, особенности электромиграционного механизма разделения аналитов ограничивают применение этого метода для анализа образцов сложного состава. Метод используют для анализа алкогольных [5, 6] и безалкогольных [8, 9] напитков после очистки и концентрирования экстрактов методом твердофазной экстракции (ТФЭ).

Применение метода ВЭЖХ с УФ- и диодно-матричным детектированием позволяет упростить процедуру подготовки проб различных напитков (в том числе и сухих) [10, 11], однако при экстракционном извлечении красителей из твердых образцов необходима очистка экстракта методом ТФЭ [11].

При масс-спектрометрическом детектировании предложено значительное упрощение пробоподготовки твердых пищевых продуктов, но для устранения матричного эффекта также проводят очистку экстракта методом ТФЭ [12, 13].

Цель данной работы заключалась в разработке простой и экспрессной методики пробоподготовки, одновременной идентификации и определения синтетических красителей в пищевых продуктах методом ВЭЖХ/квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения.

Аппаратура и реактивы. Использовали жидкостной хроматограф UltiMate 3000 (Thermo Scientific, США) в сочетании с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором maXis 4G (Bruker Daltonics, Германия). Разделение проводили на колонке Acclaim™ 120 C18 (150 × 2,1 мм, 2,2 мкм) (ThermoScientific, США) в режиме градиентного элюирования подвижной фазой.

Использовали стандартные растворы красителей (1 мкг/мл) в метаноле, приготовленные из стандартных образцов Fluka, Sigma и Dr. Ehrenstorfer (США, Германия), а также ацетонитрил, метанол, муравьиную кислоту, изопропанол (Merck, Германия). Рабочие растворы готовили разбавлением исходных деионированной водой (15 – 18 МОм · см, ТУ 2123-002-00213546–2004).

Условия хроматографического разделения и детектирования. В качестве подвижной фазы приме-

няли 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в воде с добавлением 5 ммоль/л формиата аммония (А) и 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (В). Градиентное элюирование проводили в соответствии с программой: 0 мин — 2 % В, 15 мин — 100 % В, 20 мин — 100 % В, 30 мин — 2 % В. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,3 мл/мин, оптимальная температура хроматографической колонки — 35 °С, объем вводимой пробы — 20 мкл.

Использовали электрораспылительную ионизацию в устройстве ionBooster (Bruker Daltonics, Германия). Установлены следующие оптимальные значения параметров: напряжение на щите капилляра — 400 В, на капилляре — 1000 В, давление газа-распылителя (азота) — 4,76 атм, поток газа-осушителя (азота) — 6 л/мин, температура газа-осушителя — 200 °С, поток газа-испарителя (азота) — 250 л/ч, температура газа-испарителя — 250 °С.

Диапазон регистрируемых масс ионов — 200 – 400 Да. В качестве калибранта масс использовали 10 мМ раствор формиата натрия в водном растворе изопропанола (1:1). Калибровку проводили в автоматическом режиме при записи хроматограммы в диапазоне 3 – 3,5 мин в случае регистрации положительных ионов и в диапазоне 17 – 17,5 мин при регистрации отрицательных ионов. Выбор условий разделения и детектирования описан в работе [14].

Пробоподготовка. В центрифужную пробирку объемом 15 мл помещали 1,0 г измельченного и усредненного образца, добавляли 5 мл ацетонитрила, встряхивали 10 мин и затем центрифугировали 5 мин при 2700 мин⁻¹. Экстракт разбавляли деионированной водой в 2 раза, перемешивали, фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) в микрофлакон и хроматографировали. При анализе напитков пробу разбавляли в 10 раз деионированной водой и фильтровали. Газированные напитки предварительно центрифугировали 5 мин при 2700 мин⁻¹ для удаления углекислого газа.

Идентификация и определение. Идентификацию красителей проводили с использованием программного продукта TargetAnalysis 1.3 (Bruker Daltonics, Германия), обработку хроматограмм по общему ионному току и хроматограмм извлеченных масс ионов — с использованием DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics, Германия), составление картины изотопного распределения аналитов — с помощью IsotopePattern (Bruker Daltonics, Германия). Идентифицированные красители определяли методом стандартной добавки. Содержания аналитов в пробе рассчитывали по формуле:

$$c_x = \frac{c_{\text{доб}}}{S_{x+\text{доб}}/S_x - 1},$$

где c_x , $c_{\text{доб}}$ — содержание аналита без добавки и с добавкой, мкг/кг, S_x , $S_{x+\text{доб}}$ — площади соответствующих хроматографических пиков.

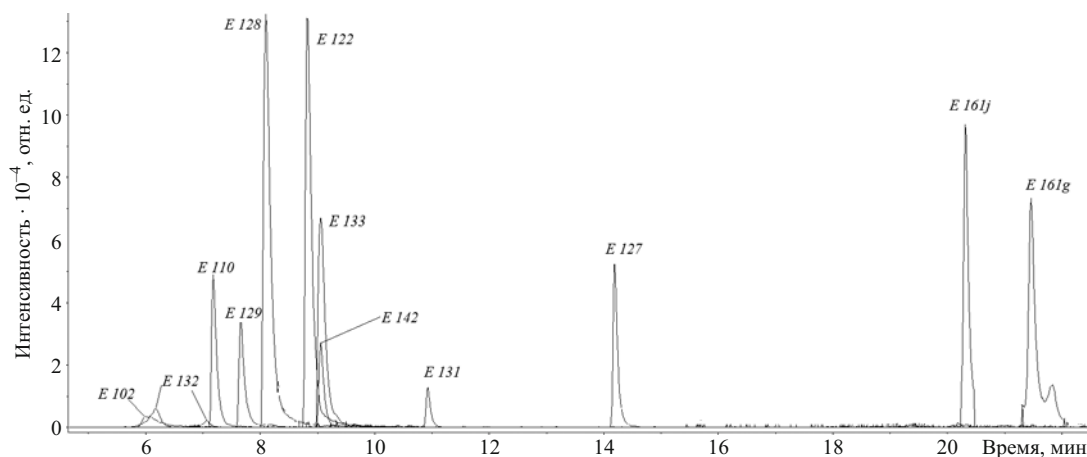


Рис. 1. Масс-хроматограммы некоторых пищевых красителей ($c = 500$ нг/мл)

В условиях электрораспылительной ионизации большинство определяемых красителей, содержащих в своей структуре 2–3 группы $-\text{SO}_3\text{Na}$, может образовывать как отрицательно, так и положительно заряженные протонированные формы: $[\text{M}^2\text{-Na}^+\text{H}]^-$, $[\text{M}^3\text{-Na}^2+\text{H}]^-$ и $[\text{M}^3\text{-Na}^+\text{H}]^{2-}$, $[\text{M}\text{-Na}^{2+}\text{H}]^+$, $[\text{M}^2\text{-Na}^{3+}\text{H}]^+$ (табл. 1, рис. 1). Следует отметить, что определение данных красителей более чувствительно в режиме регистрации отрицательных ионов (см. табл. 1). Астаксантин, кантаксантин и куркумин образуют только положительные ионы, напротив, амарант, солнечный закат, красный 2G, понсо 4R, тартразин и хинолиновый желтый образуют только отрицательные ионы.

Предел обнаружения ($c_{\text{мин}}$) и предел определения ($c_{\text{н}}$) красителей рассчитывали при отношении сигнал/шум, равном 3 и 10 соответственно: $c_{\text{мин}}$ колеблется от 0,1 до 100 нг/г в зависимости от аналита (см. табл. 1).

Погрешность определения масс ионов не превышала ± 3 ppm ($n = 3$). Идентификацию красителей проводили с использованием программного продукта TargetAnalysis 1.3. Идентификационными параметрами служили времена удерживания ($\pm 0,2$ мин), точность массы моноизотопа (m/z , ± 5 ppm) и совпадение картины изотопного распределения ($m\text{Sigma} < 20$).

Обнаруженные красители определяли методом добавок [15]. Данный метод имеет следующие пре-

Таблица 1. Основные характеристики определения пищевых красителей методом масс-спектрометрии высокого разрешения

Аналит	Индекс	Ион	t_R	Моноизотопная масса, m/z	Погрешность измерения масс, ppm	$c_{\text{мин}}$, нг/г	$c_{\text{н}}$, нг/г
Амарант	E 123	$[\text{M}^3\text{-Na}^+\text{H}]^{2-}$	7,5, 24,9	267,9822	1,3	100	300
Астаксантин	E 161j	$[\text{M}^+\text{H}]^+$	20,3	597,3938	1,1	2	6
Желтый «Солнечный закат»	E 110	$[\text{M}^2\text{-Na}^+\text{H}]^-$	7,3	407,0002	2,3	5	20
Зеленый S	E 142	$[\text{M}\text{-Na}]^-$ $[\text{M}\text{-Na}^{2+}\text{H}]^+$	9,1	554,1176 555,1254	0,9 -1,9	0,5 5	2 20
Индигокармин	E 132	$[\text{M}^2\text{-Na}^+\text{H}]^-$ $[\text{M}^2\text{-Na}^{3+}\text{H}]^+$	6,3, 7,1 6,3	420,9795 466,9590	1,3 1,3	20 20	60 60
Кантаксантин	E 161g	$[\text{M}^+\text{H}]^+$	23,3, 23,7	565,4040	1,0	2	6
Кармазин	E 122	$[\text{M}^2\text{-Na}^+\text{H}]^-$ $[\text{M}^2\text{-Na}^{3+}\text{H}]^+$	8,9	457,0159 502,9954	1,3 1,0	5 50	20 200
Кармин	E 120	$[\text{M}\text{-H}]^-$	7,4	491,0820	1,9	5	20
Куркумин	E 100	$[\text{M}^+\text{H}]^+$	13,5	369,1333	1,9	50	200
Красный 2G	E 128	$[\text{M}^2\text{-Na}^+\text{H}]^-$	8,2	464,0217	0,7	2	6
Красный очаровательный AC	E 129	$[\text{M}^2\text{-Na}^+\text{H}]^-$ $[\text{M}^2\text{-Na}^{3+}\text{H}]^+$	7,8	451,0264 497,0059	-1,2 2,3	5 50	20 200
Патентованный синий V	E 131	$[\text{M}^2\text{-Ca}]^{2-}$ $[\text{M}^2\text{-Ca}^+\text{H}]^+$	11,0	559,1567 1121,3374	0,9 -3,0	2 2	6 6
Понсо 4R	E 124	$[\text{M}^3\text{-Na}^{2+}\text{H}]^-$	24,9	536,9727	3,0	100	300
Синий блестящий	E 133	$[\text{M}^2\text{-Na}^+\text{H}]^-$ $[\text{M}^2\text{-Na}^{3+}\text{H}]^+$	9,1 9,2	747,1510 749,1656	3,0 -2,0	2 10	6 40
Тартразин	E 102	$[\text{M}^3\text{-Na}^{2+}\text{H}]^-$	8,9	466,9961	2,9	10	50
Эритрозин	E 127	$[\text{M}^2\text{-Na}^+\text{H}]^-$ $[\text{M}^2\text{-Na}^{3+}\text{H}]^+$	14,2	834,6478 836,6623	-1,3 1,2	0,1 20	0,5 60
Хинолиновый желтый	E 104	$[\text{M}^2\text{-Na}^+\text{H}]^-$	6,8, 7,5	431,9842	1,9	5	20

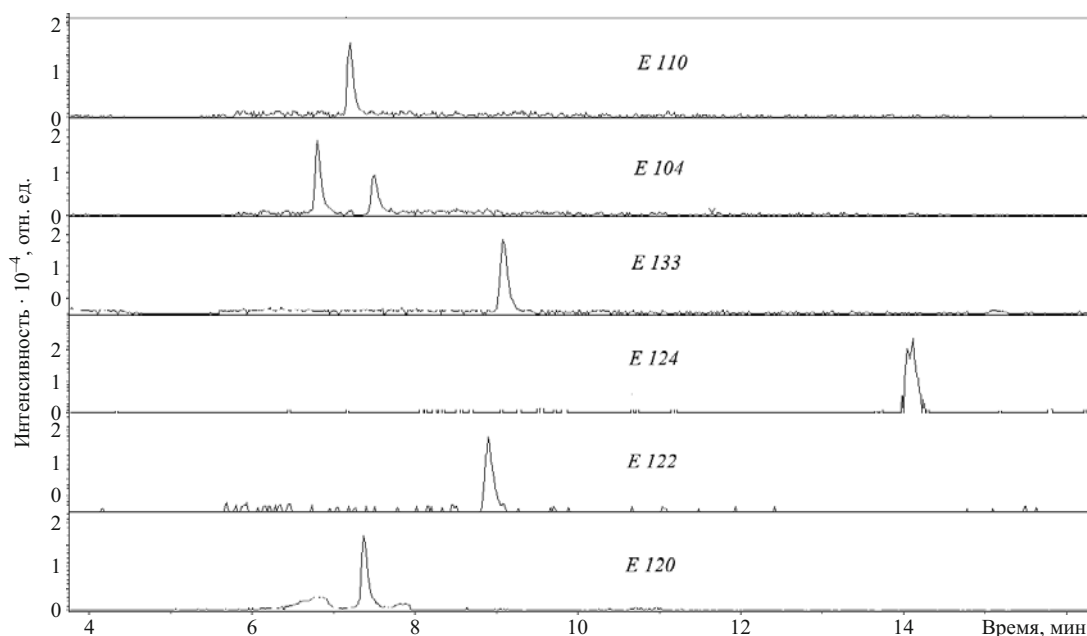


Рис. 2. Масс-хроматограммы экстрактов красителей из мармелада

имущества перед методом внешнего стандарта (градуировочного графика): нет необходимости устанавливать степень извлечения аналитов; требуется меньше дорогостоящих стандартных образцов сравнения (экономичность) и нет необходимости периодической проверки стабильности градуировочных характеристик; повышается точность определения; нивелируется матричный эффект.

В табл. 2 представлены результаты идентификации и определения ряда красителей в пищевых продуктах. В качестве примера на рис. 2 представлены масс-хроматограммы экстракта мармелада, в котором обнаружено 6 красителей, заявленных производителем. Относительное стандартное отклонение резуль-

татов анализа не превышало 0,1, продолжительность анализа — 0,5 – 1 ч.

Таким образом, предложена простая пробоподготовка для одновременной идентификации и определения 17 синтетических красителей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения. Идентификацию проводили по трем параметрам — времени удерживания, точной массе иона красителя и характеру его изотопного распределения в масс-спектре (mSigma). Обнаруженные красители определяли методом добавок. Разбавление экстракта и использование метода добавок при анализе позволили нивелировать матричный эффект, а также удеше-

Таблица 2. Содержание красителей в проанализированных пробах ($n = 3$; $P = 0,95$)

Продукт	Краситель	Найдено, мг/кг	s_p
Форель	Астаксантин	$1,2 \pm 0,1$	0,08
Креветки	Астаксантин	$0,20 \pm 0,06$	0,10
Яйцо куриное	Кантаксантин	$0,92 \pm 0,04$	0,07
Мармелад	Солнечный закат	95 ± 9	0,09
	Хинолиновый желтый	86 ± 7	0,09
	Синий блестящий	110 ± 10	0,11
	Понсо 4R	89 ± 9	0,11
	Кармазин	100 ± 10	0,07
	Кармин	96 ± 7	0,09
Карамель M&Ms	Зеленый S	$0,099 \pm 0,001$	0,05
	Кармазин	$0,087 \pm 0,009$	0,10
	Понсо 4R	$0,95 \pm 0,06$	0,08
	Солнечный закат	$0,99 \pm 0,09$	0,10
	Хинолиновый желтый	$0,088 \pm 0,008$	0,09
Витамины «Супрадин»	Красный очаровательный АС	$1,3 \pm 0,1$	0,09
	Кантаксантин	$0,098 \pm 0,006$	0,08
Желе малиновое	Красный очаровательный АС	156 ± 11	0,09

вить и упростить определение синтетических красителей в пищевых продуктах.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Yamjala K., Nainar M. S., Ramiseti N. R.** Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry — a review / *Food Chem.* 2016. Vol. 192. P. 813 – 824.
2. ГОСТ 31701–2012. Продукты пищевые. Метод определения наличия синтетических красителей в пряностях. — М.: Стандартинформ, 2014.
3. ГОСТ Р ИСО 13496–2013. Мясо и мясные продукты. Обнаружение красителей. Метод тонкослойной хроматографии. — М.: Стандартинформ, 2014.
4. ГОСТ 32050–2013. Продукты пищевые. Методы идентификации и определения массовой доли синтетических красителей в карамели. — М.: Стандартинформ, 2014.
5. ГОСТ 32073–2013. Продукты пищевые. Методы идентификации и определения массовой доли синтетических красителей в алкогольной продукции. — М.: Стандартинформ, 2014.
6. ГОСТ 31765–2012. Вина и виноматериалы. Определение синтетических красителей методом капиллярного электрофореза. — М.: Стандартинформ, 2013.
7. М 04-48–2012. Безалкогольная, соковая, винодельческая, ликероводочная и пивоваренная продукция. Методика измерений массовой концентрации синтетических пищевых красителей методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель». URL: www.lumex.ru.
8. **Perez-Urquiza M., Beltran J. L.** Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis / *J. Chromatogr. A.* 2000. Vol. 898. P. 271 – 275.
9. **Berzas Nevado J. J., Guiberteau Cabanillas C., Contento Salcedo A. M.** Method development and validation for the simultaneous determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis / *Anal. Chim. Acta.* 1999. Vol. 378. P. 63 – 71.
10. **Alves S. P., Brum D. M., De Andrade E. C. B., Netto A. D. P.** Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection / *Food Chem.* 2008. Vol. 107. P. 489 – 496.
11. **Bonan S., Fedrizzi G., Menotta S., Elisabetta C.** Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector / *Dyes and Pigments.* 2013. Vol. 99. P. 36 – 40.
12. **Ji Ch., Feng F., Chen Zh., Chu X.** Highly sensitive determination of 10 dyes in food with complex matrices using SPE followed by UPLC-DAD-tandem mass spectrometry / *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* 2011. Vol. 34. P. 93 – 105.
13. **Ma M., Luo X., Chen B., et al.** Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry / *J. Chromatogr. A.* 2006. Vol. 1103. P. 170 – 176.
14. **Амелин В. Г., Андоралов А. М., Тимофеев А. А.** Идентификация и определение микотоксинов и пестицидов из одной навески кормов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с время-пролетной масс-спектрометрией высокого разрешения / *Заводская лаборатория. Диагностика материалов.* 2015. Т. 81. № 10. С. 14 – 23.
15. **Зенкевич И. Г., Морозова Т. Е.** Области применения и особенности количественного хроматографического анализа методом последовательных стандартных добавок / *Журн. аналит. химии.* 2014. Т. 69. № 4. С. 369 – 377.
2. State Standard GOST 31701–2012. Produkty pishchevye. Metod opredeleniya nalichiya sinteticheskikh krasitelei v pryanyostyakh [Food products. Method for determination of artificial colors in spices presence]. — Moscow: Standartinform, 2014 [in Russian].
3. State Standard GOST R ISO 13496–2013. Myaso i myasnye produkty. Obnaruzhenie krasitelei. Metod tonkosloinoi khromatografii [Meat and meat products. Detection of coloring agents. Method using thin-layer chromatography]. — Moscow: Standartinform, 2014 [in Russian].
4. State Standard GOST 32050–2013. Produkty pishchevye. Metody identifikatsii i opredeleniya massovoi doli sinteticheskikh krasitelei v karameleli [Food products. Methods for identification and determination of artificial colors mass fraction in caramel]. — Moscow: Standartinform, 2014 [in Russian].
5. State Standard GOST 32073–2013. Produkty pishchevye. Metody identifikatsii i opredeleniya massovoi doli sinteticheskikh krasitelei v alkal'noi produktsii [Food products. Methods for identification and determination of artificial colors mass fraction in alcoholic production]. — Moscow: Standartinform, 2014 [in Russian].
6. State Standard GOST 31765–2012. Vina i vinomaterialy. Opredelenie sinteticheskikh krasitelei metodom kapillyarnogo élektroforeza [Wines and wine materials. Determination of synthetic dyes by capillary electrophoresis method]. — Moscow: Standartinform, 2013 [in Russian].
7. М 04-48–2012. Bezalkogol'naya, sokovaya, vinodel'cheskaya, likerovodochnaya i pivovarennaya produktsiya. Metodika izmerenii massovoi kontsentratsii sinteticheskikh pishchevykh krasitelei metodom kapillyarnogo élektroforeza s ispol'zovaniem sistemy kapillyarnogo élektroforeza «Kapel'» [Non-alcoholic, juice, wine, distillery, and brewing products. Method for measuring the mass concentration of synthetic food dyes using the method of capillary electrophoresis using the capillary electrophoresis system “Kapel'”]. URL: www.lumex.ru.
8. **Perez-Urquiza M., Beltran J. L.** Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis / *J. Chromatogr. A.* 2000. Vol. 898. P. 271 – 275.
9. **Berzas Nevado J. J., Guiberteau Cabanillas C., Contento Salcedo A. M.** Method development and validation for the simultaneous determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis / *Anal. Chim. Acta.* 1999. Vol. 378. P. 63 – 71.
10. **Alves S. P., Brum D. M., De Andrade E. C. B., Netto A. D. P.** Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection / *Food Chem.* 2008. Vol. 107. P. 489 – 496.
11. **Bonan S., Fedrizzi G., Menotta S., Elisabetta C.** Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector / *Dyes and Pigments.* 2013. Vol. 99. P. 36 – 40.
12. **Ji Ch., Feng F., Chen Zh., Chu X.** Highly sensitive determination of 10 dyes in food with complex matrices using SPE followed by UPLC-DAD-tandem mass spectrometry / *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* 2011. Vol. 34. P. 93 – 105.
13. **Ma M., Luo X., Chen B., et al.** Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry / *J. Chromatogr. A.* 2006. Vol. 1103. P. 170 – 176.
14. **Amelin V. G., Andoralov A. M., Timofeev A. A.** Identifikatsiya i opredelenie mikotoksinov i pestitsidov iz odnoi naveski kormov metodom vysokoéffektivnoi zhidkostnoi khromatografii s vremyaproletnoi mass-spektrometriey vysokogo razresheniya [Identification and determination of mycotoxins and pesticides in feed from single sample by HPLC/TOF high resolution mass spectrometry] / *Zavod. Lab. Diagn. Mater.* 2015. Vol. 81. N 10. P. 14 – 23 [in Russian].
15. **Zenkevich I. G., Morozova T. E.** Oblasti primeneniya i osobennosti kolichestvennogo khromatograficheskogo analiza metodom posledovatel'nykh standartnykh dobavok [Areas of application and characteristics of quantitative chromatographic analysis by the consecutive standard addition method] / *Zh. Analit. Khimii.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 369 – 377 [in Russian].

REFERENCES