

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ МЕТОДОМ ИЗОТОПНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

А.Талибова, А.Колеснов, д.т.н

ФГБОУ ВПО "Московский государственный университет пищевых производств"

Статья посвящена важным проблемам оценки качества и безопасности пищевой продукции. Применение современных методов анализа, в данном случае изотопной масс-спектрометрии, позволяет доказать происхождение и разнообразные приемы фальсификации. Полученная доказательная база убедительно подтверждает случаи фальсификации ряда пищевых продуктов.

МЕТОДОЛОГИЯ АНАЛИЗА СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ ЛЕГКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

Сегодня в России для выявления фальсификации пищевой продукции и сырья используют в основном методы хроматографии или классической органической хромато-масс-спектрометрии. Однако они обладают существенным недостатком. Принцип идентификации этих методов основан на определении наличия или отсутствия в анализируемых образцах характерных компонентов-маркеров. Но многие маркеры легко доступны, их можно добавить в фальсифицируемый продукт или искусственно удалить из него. Кроме того, сырьевые источники компонентов в фальсификате могут отличаться от основного продукта, что проблематично определить с помощью хроматографических методов.

За рубежом для выявления фальсификатов пищевых продуктов применяют методы анализа стабильных изотопов легких элементов водорода ($^2\text{H}/^1\text{H}$), углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), кислорода ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$), азота ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) и серы ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$). Он эффективен как для определения географического источника сырья, так и для выяснения его происхождения (натуральное

или полученное в результате химического, биотехнологического или биохимического синтеза).

Распределение стабильных изотопов легких элементов в различных биологических и абиотических системах существенно различается. Особенности распределения связаны с процессами фракционирования, т.е. с изменением соотношения изотопов в ходе многих биологических и геохимических процессов. Способность к термодинамически упорядоченному распределению изотопов в сложных органических соединениях – специфическое свойство живых систем, поэтому изотопное отношение – хороший критерий для распознавания биогенных и абиогенных соединений [1].

Для исследований пищевых продуктов наиболее важно фракционирование изотопов углерода при фотосинтезе, а также фракционирование изотопов углерода и азота при биохимической (микробной) трансформации органического вещества. Например, накопление азота ^{15}N в трофических цепях, накопление кислорода ^{18}O в живых системах относительно источника потребляемой воды.

подавляющая часть известных экспериментальных данных относится к углероду ^{13}C , что оправдано ролью, которую играет этот элемент в химии биологических соединений. По сравнению с углеродом

неорганических соединений (CO_2 , HCO_3^-) углерод организмов обогащен легким изотопом ^{12}C . Изотопный состав углерода обычно характеризуется величиной $\delta^{13}\text{C}$, которая рассчитывается по формуле:

$$\delta^{13}\text{C} = 1000(R_1 - R_2)/R_2, (\% \text{ - промилле}),$$

где R_1 – отношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в исследуемом образце, R_2 – отношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в стандартном образце. Величина и знак $\delta^{13}\text{C}$ – относительные и зависят от выбранного стандарта (для него $\delta^{13}\text{C} = 0$). Так, знак "-" указывает на то, что исследуемый образец обеднен ^{13}C по сравнению со стандартным образцом. Все публикуемые значения $\delta^{13}\text{C}$ обычно приведены к международному стандартному образцу Pee Dee Belemnite (PDB), представляющему собой ископаемый ракушечник *Belemnitella americana* мелового периода, залежи которого находятся в Южной Каролине (США).

Биологическое фракционирование изотопов – процесс, в значительной степени локализованный на стадии начальной ассимиляции CO_2 автотрофами и обусловленный кинетическим изотопным эффектом [1]. Дальнейшее изотопное распределение может проходить уже на уровне организма в таких биохимических процессах, как дыхание, биосинтез аминокислот, окисление липидов и т.д. В этих процессах рассматривается и "термодинамическая" составляющая изотопного эффекта.

Для фотосинтезирующих растений различают два основных пути ассимиляции атмосферного CO_2 – циклы Кальвина и Хетч-Слека. В природе наиболее распространены растения, в которых усвоение CO_2 происходит по циклу Кальвина (растения C_3 -типа). При этом в качестве первичного продукта образуется трехуглеродная фосфоглицериновая кислота.

В цикле Хетч-Слека первичными продуктами оказываются четырехуглеродные соединения:

Таблица 1. Изотопный состав азота в различных объектах. В качестве стандарта использован воздух

Образец	$\delta^{15}\text{N}_{\text{воздух}}, \%$
Атмосферный азот N_2	0
C_3 – растения (деревья)	-8–4
Океанический планктон	-3–18
NH_4	4–20
Неорганические синтетические удобрения	-4–4
Органические удобрения	6–30
Коровье молоко	1–3

малат и аспаратат. Этот цикл присущ растениям C_4 -типа. К ним относится, например, ряд культурных растений преимущественно тропического и субтропического происхождения – кукуруза, просо, сорго, сахарный тростник. Как правило, это высокопродуктивные растения, устойчиво осуществляющие фотосинтез при значительных повышениях температуры, а также в засушливых условиях. В растениях C_4 -типа более полно и экономично используются атмосферный CO_2 и вода, более высокая продуктивность фотосинтеза, а их физиологические особенности рассматриваются как результат возникшей в ходе эволюции адаптации к условиям внешней среды.

Диапазоны колебаний изотопного состава растительных типов C_3 и C_4 существенно различны и даже не перекрываются. В C_3 -растениях $\delta^{13}\text{C}$ варьируется от -22 до -32‰ (для растений российских территорий – от -25,5 до -31,2 ‰). Углерод C_4 -растений значительно тяжелее, поэтому в них $\delta^{13}\text{C}$ лежит в интервале от -10 до -18‰ (по некоторым данным – от -6 до -19‰) [2, 3]. Пониженным по сравнению с ^{13}C содержанием ^{12}C отличаются и почвы плантаций C_4 -растений.

Исследован и третий тип фотосинтеза, характерный для растений семейства толстянковых (САМ-метаболизм – Crassulacean Acid Metabolism). Фотосинтез по типу толстянковых растений сочетает в себе черты C_3 - и C_4 -типа. Изменение содержания изотопа ^{13}C у САМ-растений зависит от обеспеченности водой (низкая динамика выделения в засуху, повышенная – во влажных условиях).

Изменения изотопного состава азота $\delta^{15}\text{N}$ при деструкции растительных остатков выражены намного сильнее, чем изменения $\delta^{13}\text{C}$ (табл.1). При ассимиляции азота почвенные микроорганизмы в значительной степени фракционируют изотопы. Биохимические реакции азотного цикла, такие как нитрификация и аммонификация, могут сопровождаться сильным – в десятки промилле – изменением $\delta^{15}\text{N}$. Также тяжелый азот накапливается в пищевых цепях, поскольку доля тяжелого изотопа снижается в выводимых из организма продуктах азотного обмена при их формировании.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ МЕТОДОМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗОТОПНОГО СОСТАВА

Сахар был одним из первых продуктов, для исследования которых использовалась методология изотопных отношений углерода. В ходе экспериментальных исследований установили, что тростниковый и свекловичный сахар имеет

разные изотопные отношения, соответствующие значениям показателя $\delta^{13}\text{C}$ для C_3 - и C_4 -растений. Методология стабильных изотопов углерода применялась также для проверки и подтверждения подлинности кленового сиропа. Величина $\delta^{13}\text{C}$ подлинного кленового сиропа лежит в интервале от -22,4 до -24,8 ‰, в то время как ее значения для тростникового сахара и сиропов, полученных из зернового сырья (кукурузы), намного выше.

Методология гарантирует выявление фальсификатов меда, связанных даже с незначительным добавлением сахара или сахаросодержащих сиропов (мальтозы, глюкозы, фруктозы) различного происхождения (табл.2). В натуральном меде белковая и углеводная составляющие образуются одновременно и из одного источника. Поэтому изотопное распределение углерода в них должно быть одинаковым. Отличие изотопного состава более чем на 1‰ свидетельствует о фальсификации меда сахаром или сиропом. В ходе исследований также были выявлены различия между сотовым медом ($\delta^{13}\text{C} = -26,93\%$) и пчелиным воском тех же сот ($\delta^{13}\text{C} = -28,74\%$), кото-

рые, вероятно, связаны с фракционированием углерода на стадиях пчелиного метаболизма [4].

Важная проблема сегодняшнего дня – фальсификация алкоголя, связанная с применением спиртов не зернового происхождения. В табл.3 представлены результаты анализа спиртов, полученных из различного сырья. Одно из наглядных применений данного метода – анализ изотопного состава углерода углекислоты игристых и шампанских вин. Он позволяет установить, была ли соблюдена технология производства и проходило ли исследуемое вино стадию вторичного брожения. Также можно определить, какой сахар использовался при вторичном брожении – свекловичный, тростниковый, сахаросодержащие продукты или виноградное сусло.

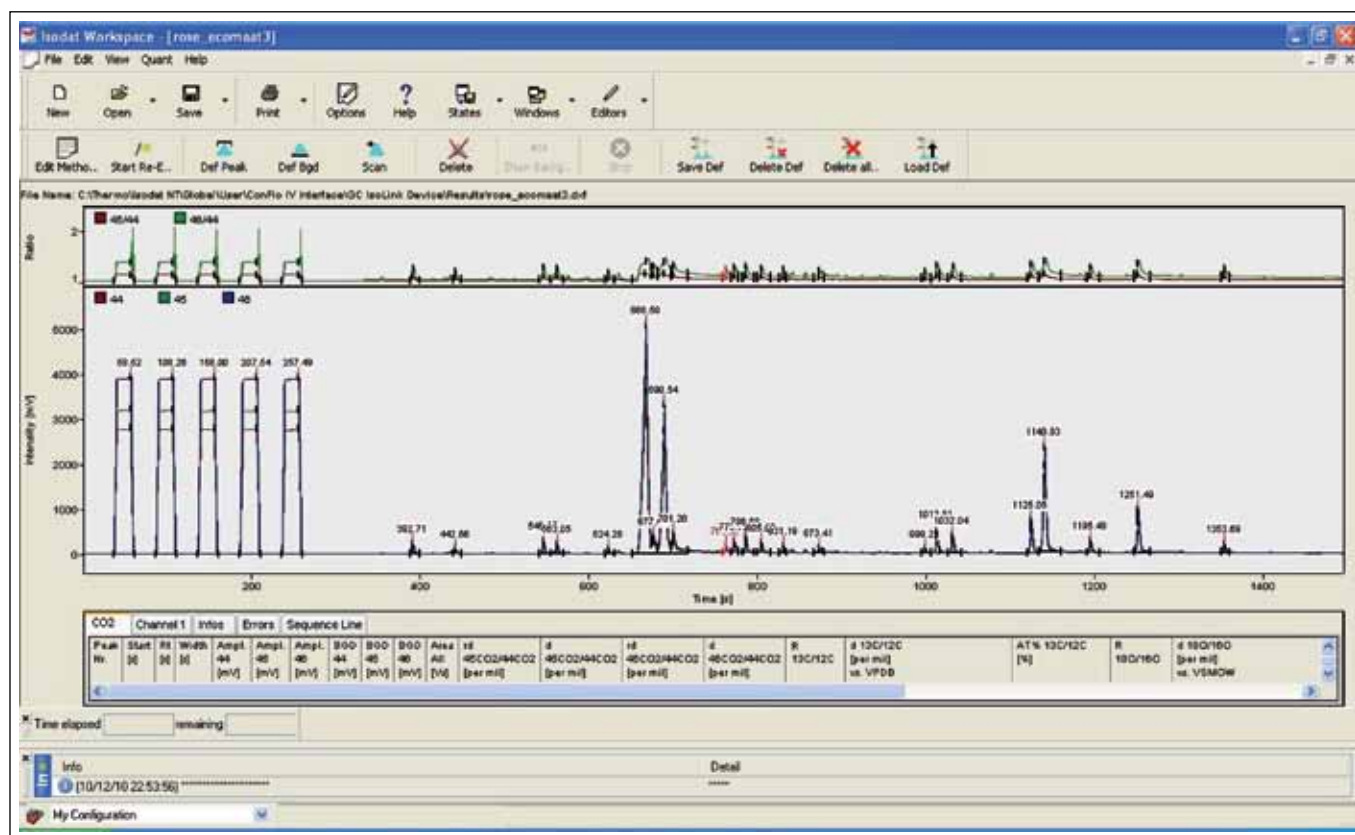
Высокоэффективна методология и при исследовании соков и соковой продукции. Фальсификацию соков прямого отжима путем добавления экзогенной воды можно определить, изучая изотопный состав кислорода и водорода их водной части. А добавления чужеродных сахаров и кислот выявляются при исследовании изотопов углерода компонентов соков [5, 6].

Таблица 2. Данные изотопного состава углерода натуральных медов, различных регионов Сибири и Алтая. Результаты получены на изотопном масс-спектрометре Delta V с элементным анализатором Flash HT компании Thermo Fisher Scientific. Стандарт – Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB)

Место отбора меда		$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$, ‰
Алтайский край	Тогульский район, предгорье Салаира (образец 1)	-25,75
	Тогульский район, предгорье Салаира (образец 2)	-27,79
	Бийский район, предгорье	-27,52
	Солтонский район, начало Прителецкой тайги	-27,43
	Солтонский район, предгорье	-26,83
	Алексеевский район, тайга	-27,10
	с. Новичиха, четыре образца (диапазон)	-26,00...-27,34
	Из разных районов, пять образцов (диапазон)	-26,33...-28,02
Республика Алтай	Усть-Кумир, высокогорная тайга	-25,57
Новосибирская область	Кольванский район, тайга	-27,01
	Болотнинский район	-27,64
	Тогучинский район, донник	-26,95
	Чулымский район	-26,43
Читинская область	Горная тайга	-26,22

Изучение стабильных изотопов углерода показало высокую эффективность в исследовании эфирных масел, ароматизирующих веществ, ароматизаторов и ароматических экстрактов. Особенно велико прикладное значение методологии для тех групп пищевых продуктов, в которых применение ароматизаторов запрещено нормативными и законодательными документами (например, в соках и нектарах). В ряде экспериментальных исследований показано, что натуральный этилбутират – один из компонентов природного аромата из подлинного апельсинового сока – отличается по своему изотопному составу от этилбутирата, полученного биотехнологическим способом или в результате химического синтеза. Изотопные различия выявлены также между биотехнологическим и синтетическим этилбутиратом.

Особое развитие метод определения стабильных изотопов



Типичная IRMS-хроматограмма эфирного масла *Rosa Damascena*. Хроматографические пики представляют собой диоксид углерода (CO_2), полученный в результате внутривещного сжигания (окисления-восстановления) на интерфейсе GC Isolink каждого из компонентов смеси после элюирования из хроматографической колонки

углерода ароматобразующих веществ получил с внедрением современных систем и интерфейсов, позволяющих проводить предварительное разделение сложных смесей ароматобразующих соединений с использованием газовой хроматографии, пиролиза, отделения образовавшегося диоксида углерода от других газов и последующее измерение распределения изотопов на изотопном масс-спектрометре (GC-IRMS-масс-спектрометрия, см. рисунок). Данный метод высокоэффективен для выявления фальсификаций эфирных масел путем добавления ароматических изолятов различного происхождения.

Так, в табл.4 представлен изотопный состав компонентов эфирного масла розы из различных регионов Болгарии. Компоненты получены путем паровой дистилляции, причем они оказались удовлетворительными по результатам газовой хроматографии. Когда эфирное масло подвергалось фальсификации путем добавления ароматических изолятов (например, гераниола, выделенного из более дешевого сырья – герани), данные изотопного состава отдельных компонентов существенно различались. К аналогичным эффектам приводит

разнородность использованного сырья из различных регионов и купажирование конечных продуктов. Например, образец № 4 фальсифицирован не только добавлением гераниола иного происхождения, но и добавлением синтетических парафинов.

Примечательно, что парафины в розовом масле имеют более легкий по сравнению с низкокипящими компонентами изотопный состав углерода, что, возможно, связано с физиологией растения и его метаболизмом. Этот эффект требует допол-

Таблица 3. Различия в изотопном составе углерода этанола, полученного в результате брожения и синтеза

Образец	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$, ‰
Синтетический этанол	-33,8
Этанол из кукурузы	-13,2
Этанол из зерна (пшеница)	-23,9
Этанол из сахарного тростника	-10,8
Этанол, полученный путем гидролиза	-20,7
Органические удобрения	6–30
Коровье молоко	1–3

Таблица 4. Результаты исследований эфирного масла *Rosa Damascena* (Болгария) методом GC-IRMS-масс-спектрометрии (масс-спектрометр Delta V с интерфейсом для газового хроматографа GC Isolink компании Thermo Fisher Scientific)

Образец	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$, ‰		
	Цитронеллол	Гераниол	Нонадекан ($\text{C}_{19}\text{H}_{40}$)
Эфирное масло <i>Rosa Damascena</i> , Болгария, Мирково	-28,5	-27,2	-29,5
Эфирное масло <i>Rosa Damascena</i> , Казанлык, Болгария	-28,7	-28,0	-30,0
Эфирное масло <i>Rosa Damascena</i> , северная Болгария	-28,2	-27,0	-29,6
Эфирное масло, Болгария, образец № 4	-27,9	-25,4	-35,7

нительных исследований изотопного состава углерода отдельных фракций эфирного масла, выделенного из растений.

Таким образом, широкое использование методологии стабильных изотопов легких элементов на протяжении последних 30 лет наглядно демонстрирует ее высокую эффективность, селективность и достоверность результатов. Она применима как в области научных исследований, так и для оценки и контроля качества пищевых продуктов. Особое значение метод приобретает для выявления фальсификаций продуктов, их идентификации и определения географического происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Галимов Э.М.** Природа биологического фракционирования изотопов. – М.: Наука, 1981.
2. **Smith B.N., Epstein S.** Two Categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios for Higher Plants. – *Plant Physiology*, 1971, v.47(3), p.380–384.
3. **Yi Xian-Feng, Yang Yue-Qin, Zhang Xiao-Ai, Li Lai-Xing, Zhao Liang.** No C_4 Plants Found at the haibei Alpine Meadow Ecosystem Research Station in Qinghai, China: Evidence from Stable Carbon Isotope Studies. *Acta Botanica Sinica*, 2003, v.45(11), p.1291–1296.
4. **Doner L.W., Chia D., White J.W.** Mass spectrometric $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ determinations to distinguish honey and C_3 plant syrups from C_4 plant syrups (sugar cane and corn) in candied pineapple and papaya. – *Journal of AOAC*, 1979, v.62, p.928–930.
5. **Krueger H.W., Reesman R.H.** Carbon isotope analyses in food technology – Mass spectrometry review, 1982, №1, p.205–236.
6. **Gremaud G., Hilkert A.** Isotopic-Spectroscopic Technique: Stable Isotopic Ratio Mass Spectrometry (IRMS)/Modern Techniques for Food Authentication/Ed. Da-Wen Sun. – Elsevier, 2008, p.269–312.

НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА "ТЕХНОСФЕРА"



ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО ПО ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ Сычев К.С.

Книга написана как практическое руководство, основная задача которого состоит в поэтапном тренинге начинающего специалиста как в области конкретно жидкостной хроматографии, так и в областях аналитической и физической химии в целом. Автор надеется, что руководство поможет специалисту с любым стартовым уровнем специальной подготовки пройти путь до квалифицированного аналитика и исследователя, способного разрабатывать методики самой высокой сложности.

Цена: 475 р.

МОСКВА: ТЕХНОСФЕРА,
2010. – 272 с.,
ISBN 978-5-94836-238-0

КАК ЗАКАЗАТЬ НАШИ КНИГИ?

✉ 125319 Москва, а/я 594; ☎ (495) 956-3346, 234-0110; knigi@technosphera.ru, sales@technosphera.ru