ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПИВА И ВИН МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

УДК 543.054:
543.544.5.068.7

Савчук С.А., д.х.н., Институт фармации и трансляционной медицины, Первый МГМУ им. И.М.Сеченова, serg-savchuk@yandex.ru, ФБГУ Российский центр судебно-медицинской экспертизы Минздрава России
Апполонова С.А., к.х.н., **Кузнецов Р.М.**, к.х.н., Институт фармации и трансляционной медицины, Первый МГМУ им. И.М.Сеченова

Предложен новый метод микроэкстракции для хромато-масс-спектрометрического анализа спиртных напитков, который предотвращает деградацию летучих компонентов, снижает уровень контаминации образцов и сокращает время подготовки пробы до двух минут, тем самым существенно повышая качество измерений. Исследованы экстрагируемые компоненты пива, виноградных и плодовых вин разных производителей, определены критерии подлинности алкоголесодержащих напитков, изучены состав и соотношение маркеров возраста вин.

Газовая и жидкостная хроматография давно и широко используются для изучения состава и арбитражного анализа спиртных напитков [1–3].

Для исследования спиртосодержащего объекта в основном применяют два вида хроматографического анализа. Летучие компоненты определяют с помощью газовой хроматографии (ГХ) на полярных колонках с пламенно-ионизационным (ДИП) или масс-спектрометрическим (МС) детектированием. Для этого вида анализа наиболее часто используют колонки длиной 50 м, диаметром 0,32 мм с неподвижной фазой FFAP (эфир полиэтиленгликоля и фталевой/терефталевой кислот) толщиной 0,25 мкм. Эти колонки указаны в ГОСТе определения подлинности спиртоводочной продукции [4]. Несмотря на большой внутренний диаметр, они эффективнее колонок 0,25 мкм сравнимой длины из-за более низкого давления газа-носителя. По нашим данным, вынос фрагментов неподвижной фазы колонки даже после нескольких лет работы настолько незначителен, что чистка детектора требуется гораздо реже, чем при использовании силиконовых колонок.

Эти методы хроматографии позволяют выявить большинство характерных разбавителей и ароматизаторов (1,2-пропиленгликоль, бензиловый спирт, триацетин), факты разбавления образца или несоответствия соотношений концентраций типичных компонентов. При помощи ГХ/ДИП или ГХ/МС можно идентифицировать летучие яды – в первую очередь метанол, этиленгликоль и диэтиленгликоль [5].

Вторая аналитическая процедура при идентификации подлинности и токсикологической безопасности спиртных напитков – исследование экстрагируемой среднелетучей фракции спиртосодержащих объектов. Для этого типа анализа используют высокоэффективную жидкостную хроматографию с диодно-матричным детектированием (ВЭЖХ/ДМД) и газовую хромато-масс-спектрометрию на силиконовых колонках (ГХ/МС) [1, 2]. Оба метода имеют как определенные недостатки, так и преимущества.

ВЭЖХ/ДМД позволяет количественно определить в коньяках тяжелые полярные компоненты продуктов этанолиза древесины дуба – галловую, феруловую и кофейную кислоты, что не удастся сделать методом ГХ/МС. С другой стороны, методом ВЭЖХ/ДМД невозможно корректно идентифицировать летучие компоненты древесины дуба, которые имеют приоритетное аналитическое значение при определении подлинности. Второе возможно только методом ГХ/МС, как и обзорный анализ на наличие токсикантов, который обязателен при идентификации подлинности различных спиртных напитков [6–8], в том числе водок [9–11], коньяков [12–13], самогонов [14–15] и пива [16]. Также метод ГХ/МС незаменим при определении токсичных веществ, таких как эфиры фталевой кислоты и сквален, которые могут выделяться из пластиковой тары при хранении [17–19].

Методы анализа экстрактивной фракции предполагают предварительную подготовку проб. Задача данной работы – разработка методики экспрессной микроэкстракции алкоголесодержащей продукции и исследова-

ние экстрагируемых компонентов в различных образцах, а также определение критериев подлинности, состава и соотношения маркеров возраста вин, выдержанных в контакте с древесиной дуба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка пробы для анализа методом

микроэкстракции в вiale

К 1,7 мл пробы, помещенной в вialу 2 мл, добавляли внутренний стандарт (о-ванилин) до концентрации 2 мг/л и экстрагировали 0,3 мл бутилацетата на вибромиксере Vortex в течение 30 с. После разделения анализировали верхний органический слой. Отбор пробы осуществлялся на высоте 23 мм от дна вialы.

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Анализ проводили на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором "Маэстро-αМС" ("Интерлаб", Россия). Температура узла ввода пробы – 280°C, аналитического интерфейса – 240°C. Разделение проводили на кварцевой капиллярной колонке HP-5MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, с толщиной пленки НФ 0,25 мкм. Температурная программа: 70°C (1 мин), 20°C/мин, 280°C. Скорость потока газа-носителя 0,62 мл/мин, средняя линейная скорость 29 см/с. Объем вводимой пробы 1 мкл. Регистрация сигнала в режиме полного ионного тока (SCAN) в диапазоне m/z 41–650 а.е.м. Идентификацию веществ выполняли по совпадению исследуемого и библиотечного масс-спектров с использованием библиотек NIST 2011, Wiley (W9N11) и собственных библиотек компонентов ароматизаторов в формате AMDIS.

Количественное определение компонентов в образцах

Для определения эфиров фталевой кислоты выполняли калибровку прибора с использованием смеси диэтил- и дибутилфталата. Концентрацию других эфиров фталевой кислоты рассчитывали по градуировочному коэффициенту, полученному для дибутилфталата.

Количественное определение состава компонентов древесины дуба в образцах коньяков и виски проводили по выбранным ионам: m/z 152, 151, 178, 181, 182, 99, 164, 88, 73, регистрацию сигнала проводили по полному ионному току (SCAN) в диапазоне масс m/z 29–550 а.е.м.

Количественное определение состава компонентов виноградных и плодовых вин проводили по выбранным ионам m/z : 71, 85, 91, 104, 107, 117, 120, 126, 128, 129, 131, 130, 133, 137, 138, 139, 147, 151, 154, 157, 161, 182, 192, 196, 228. Количественное определение состава компонентов пива проводили по выбранным ионам: m/z 91, 85, 104, 107, 120, 121, 130, 150,

154, 180, 244. Калибровку выполняли по фактору отклика относительно внутреннего стандарта дифениламина, концентрация которого в пробе составляла 2 мг/л.

Критерии оценки качества пива, вин, коньяков и виски по составу экстрагируемых компонентов

Критерии выбора признаков подлинности приведены в [1, 15]. Результаты определения компонентов исследуемого образца сравнивают с результатами анализа образцов сравнения или, при его отсутствии, с показателями из базы данных состава типичных образцов, наиболее близких к исследуемому по категории выдержки и типу производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности метода микроэкстракции в вiale

Обычно для извлечения аналита из спиртных напитков используют экстракцию 3 мл пробы равным объемом неполярного низкокипящего растворителя, такого как пентан или гексан [1, 2, 15, 16]. После экстракции верхний органический слой отделяют и концентрируют упариванием досуха, а затем добавляют 100 мкл этилацетата. Стадия упаривания экстракта является наиболее критичной, поскольку даже при незначительном пересушивании возможны потери наиболее летучих компонентов пробы. Поэтому упаривание стараются проводить при комнатной температуре в токе азота или в вакууме и прекращают сразу после исчезновения последних капель органического растворителя. Однако данная методика не всегда приводит к воспроизводимым результатам для наиболее легких экстрагируемых веществ, в первую очередь спиртов и эфиров. Напротив, профиль среднелетучих компонентов, например продуктов этанолиза древесины дуба, воспроизводится с погрешностью не хуже 15%. Для исключения процедуры упаривания В.Н.Власов и соавт. [15] использовали высаливание пробы хлоридом аммония, что позволило увеличить степень извлечения компонентов и получить аналитически насыщенные профили без концентрирования. Профиль экстрагированных летучих компонентов пробы становился воспроизводимым, однако при высаливании образцов коньяка наблюдали переход в экстракт компонентов сахарного колера. Это приводило к появлению большого количества фурановых соединений и продуктов их деградации в инжекторе газового хроматографа. Кроме этого, при высаливании наблюдали искажение исходных соотношений некоторых характерных веществ.

Для преодоления этой проблемы мы разработали новую методику микроэкстракции при пробоподготовке. В стандартную вialу для автоинжектора вместимостью 2 мл помещали 1,7 мл пробы, добавляли вну-

Табл.1. Перечень образцов пива и вин, исследованных методом ГХ/МС

Описание образцов	Обозначение
Пиво "Ячменный колос", 2,5 л ПЭТФ, д/р 10.06.2013, производитель: ЗАО МПБК "Очаково"	Och1
Пиво светлое "Очаково Специальное", 2,5 л ПЭТФ, д/р 24.09.2013, Р10, производитель: ЗАО МПБК "Очаково"	Och2
Пиво "Ячменный колос" светлое, 2,5 л ПЭТФ, д/р 25.09.2013, Р10, производитель: ЗАО МПБК "Очаково"	Och3
Пиво "Ochakovo Stolichnoe Premium", алк. 4,6%, 0,5 л, стеклянная бутылка, д/р 08.08.2013, производитель: ЗАО МПБК "Очаково"	Och5
Пиво "Клинское Светлое" светлое пастеризованное, 0,5 л, стеклянная бутылка, д/р 26.07.2013, производитель: ОАО "САН ИнБев" Московская обл., г. Клин	Klin
Пиво светлое пастеризованное фильтрованное "Жигули Барное" 4,9% алк., 0,5 л, стеклянная бутылка, д/р 02.10.2013, производитель: ЗАО "Московская пивоваренная компания"	Jiguli
Пиво классическое светлое Krombacher Pils, 4,8% алк., 0,5 л, стеклянная бутылка, д/р 01.07.2013, производитель: Кромбахер Брауерай Бернхард Шадеберг ГМБХ, Германия	Krom
Пиво светлое Tuborg Green, 4,6% алк., 0,5 л, стеклянная бутылка, д/р 06.06.2013, производитель "Балтика-Тула"	Tub
Вино красное полусухое, географического наименования (регион Долина Централь) Sunrise Merlot, 13% алк., 0,75 л, стеклянная бутылка, д/р 26.06.2013, производитель: Viña Concha y Toro S.A., Чили	Sun
Вино гранатовое сухое Rimón Pomegranate Dry Red Vine 13,8% алк., 0,75 л, стеклянная бутылка, д/р 11.11.2013, производитель: Rimón Winery, Израиль	Granat
Вино красное сухое "Фанагория NR Каберне", производитель: ОАО АПФ "Фанагория", Краснодарский край, Россия	Fanag_Nr
Вино красное сухое "Каберне Шато ле Гран Восток", производитель: ОАО "Аврора", Краснодарский край, Россия.	Aurora
Вино сухое белое "Шардоне", "Кубанский винодел", производитель: ООО КПП "Северское", Краснодарский край, Россия	Kubvinodel
Белое сухое "Аконкагуа Коста Совиньон Блан" 2013 г., Эрразурис, Чили	Sov
Вино белое сухое "Финка Симонасси Шардоне", Аргентина	Sard_Arg
Вино красное сухое контролируемого наименования по происхождению Reserva Rioja 2005, производитель: Bodegas Heredad de Baroja S.A., Испания	Rioja
Вино красное сухое "Cru Lermont Пино Нуар", производитель: ОАО АПФ "Фанагория", Краснодарский край, Россия	Cru Lermon
Вино красное сухое Sangre de Toro, алк. 13,5%, производитель: Miguel Torres S.A., Испания	Torres

тренний стандарт и 280 мкл экстрагента – бутилацетата. Пробу экстрагировали на вибровстряхивателе 2 мин и после разделения водного и органического слоев анализировали верхний органический слой. Отбор пробы выполняли в автоматическом режиме, прокалывая иглой шприца полимерную мембрану крышки виалы. Для этого устанавливали иглу шприца таким образом, чтобы отбирать 1 мкл из верхнего слоя. Подобный под-

ход позволил избежать деградации летучих компонентов, который неизбежно происходил при традиционном способе концентрирования экстрактов пробы упариванием. Поскольку подготовку пробы и ее анализ проводили в одноразовой стеклянной герметично закрытой виале, удалось резко снизить уровень лабораторного загрязнения пробы и уменьшить время подготовки с 35 до 2 минут.

Табл.2. *Натуральные компоненты, идентифицированные в пиве*

Компонент	Структурная формула	Время удерживания, мин	Базовый ион, m/z	Характеристика
Фенилэтиловый спирт		6,57	91	Основной компонент пива и вин
2,3-Дигидробензофуран		6,11	120	Основной компонент пива
2-Фенилэтилацетат		7,74	104	Основной компонент пива
2-Метокси-4-винилфенол		8,23	150	Основной компонент пива
γ-Ноналактон		8,60	85	Компонент пива, для вин не характерен
3-Гидроксibenзальдегид		8,51	121	Минорный компонент пива
2-(4-Гидроксифенил)этанол		9,06	107	Основной компонент пива и вин
4-Метил-2,5-диметоксibenзальдегид		10,05	180	Минорный компонент пива
Триптофол		11,45	130	Минорный компонент пива и вин
Гексагидро-3-(2-метилпропил)-пирроло-[1,2-a]-пиразин-1,4-дион		12,41	154	Минорный компонент пива
Гексагидро-3-(фенилметил)-пирроло-[1,2-a]-пиразин-1,4-дион		15,60	224	Минорный компонент пива

Подобный подход позволил резко (до 5–8% погрешности) повысить воспроизводимость определения всех, в том числе и летучих, компонентов. Также удалось предотвратить дискриминацию и обогащение экстракта.

Идея экстракции в виале, послужившая основой метода, и выбор экстрагента – бутилацетата были предложены Н.А.Крупиной, заведующей судебно-химическим отделом "Бюро судебно-медицинской экс-

пертизы", которой авторы выражают искреннюю благодарность.

Исследование состава экстрактивных компонентов натуральных качественных вин и пива

Образцы пива, выбранные для анализа, указаны в табл.1, а состав идентифицированных натуральных компонентов и загрязнителей представлен в табл.2. Результаты

Табл.3. Результаты сравнительного определения компонентов пива

Компонент	Ион, m/z	Содержание в образце пива, мг/мл							
		Jiguli	Klin	Och1	Och2	Och3	Och5	Tub	Krom
Фенилэтиловый спирт	91	21,06	38,70	38,30	27,77	28,20	31,71	27,34	39,97
2,3-2,3-Дигидробензофуран	120	1,90	2,14	1,70	1,96	1,80	3,21	0,91	1,16
2-Фенилэтилацетат	104	1,17	2,12	2,30	1,27	1,56	1,97	1,75	3,34
2-Метокси-4-винилфенол	150	5,75	5,32	4,20	5,05	4,34	8,18	2,04	2,17
2-(4-Гидроксифенил)этанол	107	5,40	7,41	11,80	9,59	8,84	11,96	8,47	15,98
γ-Ноналактон	85	0,57	0,34	0,40	0,39	0,39	0,47	0,22	0,25
Триптофол	130	1,01	2,13	0,90	0,93	0,73	0,82	1,27	1,76
4-Гидроксibenзальдегид	121	0,02	0,03	0,20	0,10	0,09	0,02	0,15	0,05
4-Метил-2,5-диметокси-бензальдегид	180	0,57	0,42	0,60	0,68	0,68	1,34	0,26	0,50

■ вещества, характерные одновременно для пива и вин ■ вещества, характерные для пива

сравнительного определения природных экстрагируемых компонентов пива приведены в табл.3. Сравнивая хроматографические профили и результаты исследования соединений, содержащихся в пиве и винах (табл.3 и 4), извлекаемых в бутилацетат, можно заметить, что компонентами, общими для обоих продуктов, являются фенилэтиловый спирт, 2,3-дигидробензофуран и 2-фенилэтилацетат. Вина характеризуются более широким набором экстрагируемых соединений по сравнению с пивом и обогащены фенольными соединениями. Последнее утверждение особенно относится к красным винам и служит их характерным признаком. Все исследованные отечественные марки пива (Очаково, Жигули, Клинское) имеют сходный состав компонентов, при этом в наибольшей степени варьирует 2-(4-гидроксифенил)этанол, от 5 до 11 мг/л (табл.3). По сравнению с отечественными образцами, в пиве импортных марок (Tub и Krom) несколько занижено содержание 2-метокси-4-винилфенола. Содержание этого соединения в образцах импортного пива не превышает 2,17 мг/л, тогда как в отечественных марках его концентрация лежит в диапазоне 4–8 мг/л. В пиве Krom обнаружено более высокое, по сравнению с другими образцами, содержание 2-(4-гидроксифенил)этанола, 16 мг/л против 4–8 мг/л.

Следует отметить, что отечественные методики производства пива использует только компания "Очаково",

остальные российские марки являются филиалами импортных брендов и используют импортные технологии.

В табл.1 также приведен список вин, выбранных для анализа. Идентифицированные в бутилацетатных экстрактах натуральные компоненты указаны в табл.4, а ароматизаторы – в табл.7.

Вызывает интерес сравнение состава экстрагируемых компонентов пива и вин (табл.3 и 5). Несмотря на значительные различия в сырье и используемых расах дрожжей, можно выделить ряд веществ, характерных как для пива, так и для вин: фенилэтиловый спирт, 2,3-дигидробензофуран, 2-(4-гидроксифенил)этанол и триптофол.

Фенилэтиловый спирт является макрокомпонентом экстракта пива и вин. В винах его концентрация выше, чем в пиве (40–80 и 25–37 мг/л соответственно). Содержание 2,3-дигидробензофурана в качественных белых виноградных винах, в гранатовом вине и в пиве сравнимо и не превышает 2–5 мг/л, тогда как в красных винах этот показатель может достигать 8–10 мг/л. 2-(4-Гидроксифенил)этанол является одним из мажорных экстрагируемых компонентов пива (8–16 мг/л), его содержание в нем сравнимо с концентрацией в белых виноградных винах. В красных виноградных винах и в гранатовом вине содержание 2-(4-гидроксифенил)этанола выше и составляет 35–50 мг/л. Триптофол практически отсутствует в исследованных нами белых винах и в гранатовом вине.

Табл.4. *Натуральные вещества, идентифицированные в экстрактах вин*

Компонент	Структурная формула	Время удерживания, мин	Базовый ион, m/z
1,2,3-Бензолтриол		7,25	126
2,6-Диметоксифенол		7,14	154
5-Оксотетрагидро-2-фуранкарбоновая кислота		6,77	85
Диэтил 2-гидрокси-3-метилсукцинат		7,28	85
Диэтилмалат		6,35	117
2,3-Дигидробензофуран		6,11	120
Диэтилтарtrat		7,23	133
транс-Ресвератрол		13,33	228
цис-Ресвератрол		15,46	228
Этил 4-гидрокси-3-метоксибензоат		9,08	151
Этил 4-гидроксициннамат		10,44	147

■ вещества, характерные для вин ■ основной компонент ■ минорные компоненты

Табл.5. Состав экстрагируемых компонентов качественных вин с высокой органолептической оценкой

Наименование	Содержание, мг/л								
	Auroга красное сухое	Torres красное сухое	Sun кр. п/сухое	Sov белое сухое	Sard_Arg белое сухое	Kubvinodel белое сухое	Cru Lermom красное сухое	Granat гранатовое сухое	Rioja красное сухое
Фенилэтиловый спирт	52,62	79,18	51,46	56,63	42,18	40,59	47,94	33,95	94,46
Моноэтилсукцинат	25,30	25,07	11,68	2,57	0,04	9,06	6,77	13,58	16,10
Диэтилсукцинат	23,32	29,03	12,93	23,29	5,68	12,17	17,94	19,58	34,05
Этил 4-гидроксидиннамат	1,21	3,10	0,04	0,56		0,17	0,77	0,87	0,65
Гомованилиновая кислота	0,05	0,10	0,18			0,01	0,38	2,01	0,13
Этил 4-гидрокси-3-метоксибензоат	0,01	0,60	0,13			0,01	0,46	0,33	0,12
5-Оксотетрагидро-2-фуранкарбоновая кислота	3,90	8,63	4,80	7,97	0,16	2,51	4,32	4,95	7,36
Диэтил 2-гидрокси-3-метоксиметилсукцинат	3,15	7,66	1,83	2,17		1,77	1,88	3,01	7,44
Триптофол	11,39	14,98	8,62		0,03	0,01	2,02	0,01	8,93
2,6-Диметоксифенол	0,72	1,69	2,35	0,06	0,04	0,06	2,42	2,32	1,85
2-(4-Гидроксифенил) этанол	34,32	52,50	33,82	12,07	17,20	16,11	10,46	25,67	30,99
Диэтилмалат	1,36	1,47	0,47	38,67	1,89	6,29	0,35	6,12	0,98
2,3-Дигидробензофуран	8,02	8,97	5,32	3,48	4,44	2,01	3,97	2,02	8,11
1,2,3-Бензтриол	2,14	0,96	0,66	0,01	0,01	0,05	0,05	3,08	0,03
цис-Ресвератрол	0,31	0,02	0,01						
транс-Ресвератрол	1,07	0,05	0,02						
Диэтилтарtrat	0,01	0,39	0,08	1,52	0,01	0,57		0,03	0,29
Триэтилцитрат	0,11	0,06	0,26	8,16		3,78	0,06	0,03	0,15
Сорбиновая кислота	0,03					0,54		2,84	
Бензойная кислота	0,15	0,93	0,10			0,35		3,01	
Бензиловый спирт	2,04	1,47	0,89	0,66	0,81	0,19	4,40	0,14	1,19

■ не определяется

В пиве его концентрация составляет 0,8–2 мг/л, красных винах – 11–14 мг/л.

В образцах пива и вин мы наблюдали вещества, имеющие в масс-спектрах одинаковые характеристичные ионы

m/z 85. В винах наблюдаемые пики были идентифицированы как 5-оксотетрагидро-2-фуранкарбоновая кислота и диэтил-2-гидрокси-3-метоксиметилсукцинат, причем в пиве этих веществ обнаружено не было. Содержание

Рис.1. Хроматографический профиль маркеров возраста вина плодового гранатового сухого Rimon Pomegranate Dry Vine (Granat)

5-оксотетрагидро-2-фуранкарбоновой кислоты варьирует в белых виноградных винах от 0,2 до 3 мг/л, в красных – от 5 до 9 мг/л. Аналогичную картину отмечали для диэтил 2-гидрокси-3-метоксиметилсукцината. Содержание этих веществ в гранатовом вине ближе к красным винам. Вещество с m/z 85, содержащееся в пиве в концентрациях 0,2–0,5 мг/л, было идентифицировано как γ -ноналактон. В винах γ -ноналактон обнаружен не был.

1,2,3-Бензтриол – минорный компонент белых вин. В красных винах его содержание различно. Так, в винах АПФ "Фанагория" это вещество обнаруживается в следовых концентрациях, а в испанских и чилийских винах, проанализированных нами, его концентрация варьирует от 0,6 до 2 мг/л.

Ресвератролы являются известными полезными компонентами вин, имеющими антиоксидантную активность. Наиболее высокое их содержание было обнаружено в вине "Каберне Шато ле Гран Восток" производства ОАО "Аврора" (Aurora).

При анализе хроматограмм по полному току качественных белых и красных виноградных вин было отмечено, что белые вина содержат диэтилмалат, тогда как красные вина содержат его в гораздо меньших концентрациях. Метилантранилат, диметилантранилат и триацетин, служащие маркерами наличия ароматизаторов, не были обнаружены ни в одном из качественных вин. Различия состава белых и красных вин даны в табл.5.

Исследование состава экстрактивных компонентов вин, выдержанных в контакте с древесиной дуба

В винах, выдержанных в дубовых бочках, определяли маркеры возраста: транс- и цис-метилокталактон, эвгенол, ванилин, этилванилин, октановую кислоту и сиреневый альдегид (табл.6). Содержание продуктов этанолиза древесины дуба в исследованных образцах оказалось различным. Так, в красном сухом вине Rioja, произведенном из винограда сорта Темпанильо и выдержанном 12 месяцев в дубовых бочках, а затем 24 месяца в бутылках, содержание маркеров возраста было ниже, чем в гранатовом вине Granat, несмотря на то, что вино Rioja выдерживали на 3 месяца дольше. Это может быть связано с технологией подготовки древесины дуба: например, для выдержки вина Rioja могли использовать дуб, обедненный экстрактивными компонентами. В гранатовом вине содержание компонентов возраста близко к их содержанию в коньяках 1,5–3-летней выдержки. ГХ/МС профиль маркеров возраста гранатового вина приведен на рис.1.

Из виноградных вин наиболее яркими по содержанию маркеров возраста были образцы испанского вина Torres. В этих винах, выдержанных 6 месяцев в бочках из французского и американского дуба, обнаруживаются следы ванилина, сиреневого альдегида и метилокталактонов. Также присутствовали этил-пара-гидроксициннамат и гексагидро-3-(фенилметил)-пирроло[1,2-а]пиразин-1,4-дион с m/z 224, который мы также идентифицировали в пиве.

Табл.6. Содержание маркеров возраста в винах, выдержанных в контакте с древесиной дуба

Название	Содержание мг/л				
	Cru Lermoin	Rioja	Granat	Torres	Sun
транс-МО-лактон	0,43	0,34	1,30	0,05	0,05
цис-МО-лактон	0,50	1,33	1,14	0,02	0,02
Эвгенол	0,03		0,08		
Ванилин	0,15	0,09	0,57	0,07	0,14
Этилванилин		0,13			
Октановая кислота	0,10	0,01	0,01	8,65	0,03
Сиреневый альдегид	0,13	0,12	1,27	0,04	0,25

■ не определяется

В большинстве исследованных вин сиреневому альдегиду сопутствует гомованилиновая кислота. Вина, контактировавшие с древесиной дуба, наряду с ванилином и сиреневым альдегидом содержат метилокталактоны. Вина, не контактировавшие с древесиной дуба, – например, вермуты – могут иногда содержать следы ванилина или ванилина и сиреневого альдегида, но метилокталактоны в них отсутствуют, что позволяет предположить применение ароматизатора. Так, в выдержанном вине Cru Lermoin есть маркеры возраста, а в вине Fanag_Nr маркеров возраста не наблюдается.

В винах Sun, выдержка которых в бочках из американского дуба составляет 3 месяца, причем выдерживают 30% виноматериала, составляющего купаж, содержание ванилина, сиреневого альдегида и лактонов оказалось меньше, чем в других образцах. В этих винах сиреневому альдегиду также сопутствуют гомованилиновая кислота и этил пара-гидроксициннамат.

Исследование состава вин с низкой органолептической оценкой

Обычно технологические нарушения наблюдают в винах низкого ценового диапазона. Нами исследован состав

Рис.2. Хроматограммы по полному ионному току и хроматографический профиль компонентов вин "Изабелла": образец "Изабелла" 2 (вверху) и образец "Изабелла" 3 (внизу). Содержание компонентов дано в табл.8

Анализ масел. Основы и применение
Фитч Дж., Тройер Д.
2015 г., 176 стр.

Анализ воды. Справочник
Ноллет Л.М. Л.
2012 г., 920 стр.

Внутренний контроль качества
Руководство для аналитических
лабораторий.
2015 г., 80 стр.

Анализ почвы. Справочник. Минералогические, органические и неорганические методы анализа.
М.Пансю, Ж.Готеру
2014 г., 800 стр.

Индуктивно-связанная плазма.
Практическое руководство
Джон Р. Дин
2017 г., 200 стр.

Анализ нефтепродуктов. Методы, их назначение и выполнение
Ранд С.Дж.
2012 г., 664 стр.

Валидация аналитических методик.
Неопределенность в аналитических измерениях.
2016 г., 320 стр.

Интернет-магазин наших изданий www.epcprof.ru

по тел./факсу: +7 (812) 313-54-14
почтой по адресу: 190020, Санкт-Петербург, а/я 140
по электронной почте: shop@epcprof.ru, info@epcprof.ru

Табл.7. Компоненты ароматизаторов и консервантов, идентифицированных в плодовых винах и в винах "Изабелла"

Компонент	Структурная формула	Время удерживания, мин	Базовый ион, m/z	Характеристика
Метилантранилат		7,14	151	Натуральный мажорный компонент винограда Изабелла
Диметилантранилат		7,60	165	Натуральный минорный компонент винограда Изабелла
Бензойная кислота		5,86	122	Консервант
Сорбиновая кислота		5,06	112	Консервант
Триацетин		7,01	Молекулярного иона 218 нет. Фрагментные ионы 145, 116, 103	Компонент ароматизатора
1,3-Октандиол		6,45	Молекулярного иона 146 нет. Фрагментные ионы 99, 83, 75	

экстрагируемых компонентов красных, белых виноградных и плодовых вин с низкой органолептической оценкой, изготовленных с технологическими нарушениями.

К наиболее часто встречающимся случаям фальсификаций можно отнести разбавление вин с добавлением ароматизаторов. В табл.7 и на рис.2 приведен состав экстрагируемых компонентов образцов вин, произведенных из винограда сорта Изабелла. Все исследованные образцы содержат разрешенные консерванты – сорбиновую и бензойную кислоты. Резкое снижение содержания всех компонентов в образце 3 свидетельствует о разбавлении образца. Наиболее близок к составу натуральных вин образец 2, содержание моноэтил-, диэтилсукцината и триптофола в котором соответствует натуральным винам, тогда как в образце 3 эти компоненты определяются в следовых количествах.

Вина, произведенные из винограда Изабелла, содержат метилантранилат – природный компонент, присущий винограду этого сорта. В то же время метилантранилат является ключевым компонентом вкусоароматических композиций (ароматизаторов), имитирующих аромат винограда и вина "Изабелла", поэтому выявление добавки ароматизатора в таких винах представляет собой известную сложность. Как идентификационный признак наличия ароматизатора мы использовали диметилантранилат, который содержится в натуральных винах "Изабелла" в концентрациях гораздо меньших, чем метилантранилат. Это позволяет установить соотношение этих веществ, характерное как для случаев добавления ароматизатора, так и для случаев его отсутствия. Вторым обязательным идентификационным признаком наличия ароматизатора служит триацетин.

Табл.8. Состав экстрагируемых компонентов некачественных виноградных и плодовых вин с низкой органолептической оценкой

Наименование экстрагируемых компонентов	Содержание, мг/л								
	Вино белое сухое Мускат	Вино красное сухое Каберне	Изабелла 1	Изабелла 2	Изабелла 3	Плодовое 1	Плодовое 2	Плодовое 3	Плодовое 4
Фенилэтиловый спирт	52,54	20,36	31,54	55,63	16,51	70,73	52,64	1,39	52,51
Моноэтилсукцинат	0,77	0,13	9,33	19,57	3,25	7,36	10,72	0,81	4,20
Диэтилсукцинат	6,09	0,42	6,65	13,67	2,26	2,47	4,41	1,56	1,11
Этил 4-гидроксидиннамат	0,08		0,21	3,09	0,33	0,50		0,01	0,01
Гомованилиновая кислота				0,07				0,28	0,01
Этил 4-гидрокси-3-метоксибензоат	0,01		0,05	0,12	0,03	0,01		0,01	
5-Оксотетрагидро-2-фуранкарбоновая кислота	2,08	0,79	1,76	2,42	1,18	3,39	2,06	0,44	2,42
Диэтил 2-гидрокси-3-метоксиметилсукцинат	1,92	0,30	1,17	1,66	0,66	1,42	1,28	0,42	0,03
Триптофол	0,12	0,01	0,16	18,63	0,07	0,79	0,15		0,48
2,6-Диметоксифенол	0,06	0,79	1,03	1,90	0,85	0,01		0,10	
2-(4-Гидроксифенил) этанол	10,68	5,13	10,99	25,78	6,25	46,64	25,13	0,07	22,77
Диэтилмалат	1,30	0,97	1,08	0,20	4,43	8,23	15,95	7,70	4,84
2,3-Дигидробензофуран	0,91	1,87	1,87	10,08	2,52	2,59	1,96	1,16	0,85
1,2,3-Бензтриол		0,07	0,50	0,83	0,27	0,10			
цис-Ресвератрол				0,01				0,01	0,01
транс-Ресвератрол				0,01					
Диэтилтарtrat			0,05		0,05	0,04	0,01	0,67	1,59
Триэтилцитрат	109,64	0,03	0,01	0,10	0,02	0,13	0,10	64,33	0,04
Сорбиновая кислота			181,18	194,88	195,43				
Бензойная кислота			0,12	0,14	37,55				
Бензиловый спирт	16,32		0,40	0,83	0,52	0,40	0,11	0,61	0,36
Метилантранилат		0,09	1,95	6,78	10,59	0,71	1,14	15,27	24,93
Диметилантранилат			0,20	10,00		12,76	8,07	73,30	142,21
Триацетин						1,24	1,74	2,85	4,96

■ не определяется

Рис.3. Фрагмент хроматограммы по полному ионному току экстракта плодового вина: а) умеренное разбавление; б) сильное разбавление

В разбавленных белых винах (табл.8) наблюдалось повышенное содержание ароматизатора триэтилцитрата, который обычно содержится в винах в крайне малых количествах.

Определение ароматизаторов в винах, содержащих сахар

Гораздо проще выявлять ароматизаторы типа "Виноград" в плодовых винах, которые по своей природе не могут содержать антранилаты. Результаты определения ароматизаторов в плодовых винах приведены в табл.9. Профили этих вин представлены на рис.3, в обоих образцах идентифицированы компоненты ароматизатора, а также нехарактерный для вин 1,3-октандиол. Следует отметить, что содержание сахара в этих образцах составляло 16%, что не позволяло провести определение ароматизаторов по наличию 1,2-пропиленгликоля на колонке FFAP, поскольку пробы с таким содержанием сахара нельзя вводить в хроматограф без экстракции.

Примененный нами метод микроэкстракции позволил определить в этих образцах компоненты ароматизатора – триацетин, метилантранилат, диметилантранилат, а также 1,3-октандиол, не встречающийся в натуральных винах. Образец "Плодовое 3", хроматограмма которого приведена на рис.3б, сильно разбавлен. Фенилэтиловый спирт, являющийся

основным компонентом экстракта вин, находится в минорных количествах (см. табл.8). В то же время, наряду с антранилатами и триацетином, этот образец содержит большую концентрацию ванилина, источником которого также может являться ароматизатор. При заниженной концентрации компонентов образец содержит резко завышенное содержание характерного для вин компонента диэтилмалата, что может свидетельствовать о его добавлении в купаж.

Определение токсичных компонентов в пиве, винах и крепких спиртных напитках

Кроме образцов вин и пива, мы исследовали поверхностные смывы с материала алюминиевых банок, воду после водоподготовки, используемую для производства пива, образцы солода, этанола, а также вермуты, коньяки и коньячные спирты различных производителей и различного качества, перечень которых приведен в табл.9.

Подготовку проб спиртных напитков проводили по методике микроэкстракции, описанной выше. Материал алюминиевых банок (2 г) нарезали на фрагменты, помещали в виалы вместимостью 4 мл, добавляли водно-спиртовую смесь, встряхивали на вибромиксере и анализировали полученный водно-спиртовой экстракт, как описано выше. Солод готовили для анализа аналогично.

Табл.9. Перечень* образцов спиртных напитков и ингредиентов, исследованных на токсикологическую безопасность

Описание образцов	Обозначение
Вода с водоподготовки "пиво", дата отбора 26.09.2013, хранение в ПЭТФ	Voda
Напиток слабоалкогольный газированный "Джин-Тоник" 9% алк., 0,5 л, алюминиевая банка, д/р 22.12.2012, изготовитель: ЗАО МПБК "Очаково"	Och_4 GinTonic
Спирт этиловый ЗАО МПБК "Очаково" кр. 96,52% об. Дата отбора 26.09.2013, хранение в стеклянной бутылке	Spirt
Солод, партия 231, хранение в ПЭТФ	Solod
Банка алюминиевая Stolichnoe Premium 22.08.2012	Banka
Банка алюминиевая Military	Banka
Спирт коньячный узбекский	Uzbek
Коньяк Hennessy XO	Henn
Коньяк Martell XO	Martell
Спирт коньячный ALTOSA 5 лет	Altosa
Спирт коньячный Lucien Bernard 5 лет	Lucien
Виски фальсификат	Wisk_Falsif

* См. также табл.1.

Сравнительное определение фталатов в пиве, винах и других объектах

В настоящее время участились случаи, когда по наличию в образцах этих веществ бракуется винодельческая продукция, поступающая на исследование в арбитражные лаборатории Роспотребнадзора. При этом в качестве нормативного документа используется ГОСТ на содержание фталатов в пластиковой таре, которые определяют в водно-спиртовой жидкости после настаивания в исследуемой пластиковой емкости. При обнаружении в алкогольной продукции дибутилфталата – пластификатора, запрещенного для производства пищевых пластмасс, делают заключение о факте хранения продукции в пластиковой таре непищевого назначения, а наличие диэтилфталата, известного денатурирующего агента для непищевых спиртов, по мнению арбитражных органов, свидетельствует о добавлении непищевого спирта в купаж.

Количественное определение эфиров фталевой кислоты (фталатов) в спиртных напитках, спиртах, а также других объектах органической природы затруднено тем, что эти вещества широко используются в химической промышленности как пластифика-

торы и являются одними из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды. В том числе они являются, наряду со скваленом, наиболее значимыми компонентами лабораторного загрязнения. Так, различные эфиры фталевой кислоты присутствуют в фоне аналитического оборудования, в растворителях и реактивах [2, 6, 7, 8].

Исходя из этого, на первом этапе исследования мы оценили фон прибора по определяемым веществам. Установлено, что фон прибора по фталатам и сквалену после кондиционирования бутилацетатом в течение трех дней в режиме анализа на порядок величины ниже концентраций этих веществ, определяемых в пиве.

На втором этапе исследовали состав эфиров фталевой кислоты в пиве, воде после водоподготовки, солоде, в поверхностных загрязнениях алюминиевых банок. Также идентифицировали загрязнители, сопутствующие фталатам и сквалену. Идентифицированные нами загрязнители приведены в табл.10. Бисфенол А во всех исследованных образцах присутствовал в минорных концентрациях и не мог существенно влиять на токсикологические свойства исследуемого объекта. В то же время фталаты и сквален оказались

Табл.10. Загрязнители, идентифицированные в спиртных напитках

Компонент	Структурная формула	Время удерживания, мин	Базовый ион, m/z	Характеристика
Бисфенол А		13,90	213	Минорный компонент, загрязнитель
Сквален		21,01	69	Минорный компонент, загрязнитель
Диэтилфталат		10,25	149	Минорный компонент, загрязнитель
Дибутилфталат		12,49	149	Минорный компонент, загрязнитель
Диоктилфталат		16,77	149	Минорный компонент, загрязнитель

наиболее значимыми загрязнителями, содержание которых мы определяли количественно. Особое внимание было уделено сравнению случаев хранения готовой алкогольной продукции в пластиковой, стеклянной таре и алюминиевых банках (табл.11). Мы исследовали образцы пива "Очаково" Och_1, Och_2, Och_3, разлитые в емкости из полиэтилентерефталата, в сравнении с образцами пива Tub, Och_5 и Jiguli, разлитыми в стеклянные бутылки, и не увидели значимых различий в содержании эфиров фталевой кислоты в этих образцах. Концентрация диэтилфталата в пиве Jiguli была выше, чем в других образцах, однако и она находилась на уровне фона прибора, что не позволяет судить о сколько-нибудь значимом загрязнении.

Можно с уверенностью утверждать, что емкости для розлива пива из полиэтилентерефталата являются токсикологически безопасными и не содержат токсичных компонентов.

Содержание фталатов в солоде, спирте, воде после водоподготовки и концентрация этих веществ на

поверхности алюминиевых банок также не превышали фоновых значений.

Более значительные, по сравнению с пивом, концентрации эфиров фталевой кислоты мы наблюдали в винах. Так, в красном вине Sunrise, как и других исследованных нами винах, содержание дибутилфталата было выше, чем в пиве в 1,5–2,5 раза (табл.11). На хроматограммах профилей фталатов в винах дибутилфталат доминировал. Содержание дибутилфталата в коньяках и коньячных спиртах было выше, чем в винах, в 4–6 раз в случае анализа известных брендов Hennessy и Martell. В случае анализа виски низкого качества содержание дибутилфталата в этом образце было более высоким, в 40 раз выше, чем в винах, и на порядок величины выше, чем в натуральных коньяках.

По результатам исследования натуральных спиртных напитков можно сделать следующие выводы. Концентрация дибутилфталата и сопутствующих ему эфиров фталевой кислоты зависит от крепости напитка при том условии, что производители обеспечивают сравнимую технологическую чистоту про-

Табл.11. Определение эфиров фталевой кислоты и сквалена в образцах пива, воды, солода, вин, коньяков, коньячных спиртов и виски

Образец	Содержание, мг/мл				
	Диэтилфталат	Дибутилфталат	Бензилбутилфталат	Диизооктилфталат	Сквален
Jiguli	0,14	0,04		0,03	0,06
Klin	0,01	0,02		0,02	0,07
Och_1	0,03	0,02		0,05	0,09
Och_2	0,01	0,02		0,04	0,03
Och_3	0,01	0,02		0,01	0,11
Och_5	0,03	0,02		0,03	0,10
Krom	0,03	0,02		0,04	0,14
Tub	0,04	0,02		0,02	0,10
Och_4 GinTonic	0,01	0,02		0,01	0,02
Solod	0,01	0,02			0,05
Spirt	0,01	0,02			
Voda	0,01	0,01			
Banka1					
Banka2					
Fanag_NR	0,02	0,03	0,01	0,01	0,03
Cru Lermom	0,03	0,06		0,03	0,08
Kubvinodel	0,02	0,11	0,04	1,11	0,10
Sov	0,01	0,07	0,09	0,95	0,07
Sard_Arg	0,04	0,03	0,01	0,01	0,05
Aurora	0,01	0,06		0,02	0,04
Rioja	0,02	0,05	0,01	0,01	0,05
Torres	0,03	0,06		0,03	0,06
Granat	0,04	0,03	0,01	0,01	0,05
Sunrise	0,01	0,08		0,03	0,13
Altosa	0,10	1,13	0,04	1,11	0,11
Henn	0,01	0,41	0,09	0,95	0,08
Martell	0,01	0,20	0,05	0,36	0,02
Uzbek	0,01	1,24		0,03	0,02
Lucien	0,08	0,75	0,03	0,80	0,07
Wisk_Falsif	0,23	6,21		0,04	0,11

■ не определяется

изводства. Поскольку фталаты являются наиболее массовыми технологическими загрязнителями, при производстве спиртных напитков неизбежен контакт сырья, компонентов и готового продукта с пластиковыми шлангами, уплотнителями и другими технологическими элементами линий розлива, купажных чанов, магистралей и проч. Поскольку эфиры фталевой кислоты являются компонентами, хорошо растворимыми в спирте, с увеличением крепости напитка растёт содержание в нем фталатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Савчук С.А., Власов В.Н., Апполонова С.А., Арбузов В.Н., Веденин А.Н., Мезинов А.Б., Григорьян Б.Р.** Применение хроматографии и спектрофотометрии для идентификации подлинности спиртных напитков // Журн. анал. химии. 2001. Т. 56. № 3. С. 246.
2. **Савчук С.А., Нужный В.П., Рожанец В.В.** Химия и токсикология этилового спирта и напитков, изготовленных на его основе. Хроматографический анализ спиртных напитков. М.: URSS. "Либроком", 2011. 181 с.
3. **Нужный В.П., Рожанец В.В., Савчук С.А.** Химия и токсикология этилового спирта и напитков, изготовленных на его основе. Токсикология. М.: URSS. "Либроком", 2011. 201 с.
4. Государственный стандарт Российской Федерации. Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности. ГОСТ Р 51786, 2001. М.: Госстандарт России, 2001. 9 с.
5. **Савчук С.А., Веденин А.Н., Изотов Б.Н.** Оксипутират, его прекурсоры и метаболиты // Наркология. 2002. № 3. С. 37.
6. **Савчук С.А., Чибисова М.В., Анохин Л.А.** Способ выявления и определения происхождения неизвестных веществ в спиртных напитках. Патент на изобретение (19)RU(11) 2392616 С 1 МПК G01N 30/02 (2006 01). Опубликовано 20.06.2010 Бюлл. № 17.
7. **Савчук С.А., Апполонова С.А.** Двухканальный газовый хроматограф для выявления фальсифицированного алкоголя и летучих ядов. Патент на полезную модель (19)RU(11) 83849 (13) U1 (51) МПК G01N 30/02 (2006.01). Опубликовано 20.06.2009 Бюлл. № 17.
8. **Савчук С.А.** Система удаленной идентификации и распознавания объектов сложного состава. Патент на полезную модель (19)RU(11) 77474 (13) (51) МПК G06K 17/00 (2006.01). Опубликовано 20.10.2008 Бюлл. № 29.
9. **Савчук С.А., Колесов Г.М.** Маркеры природы этилового спирта: хроматографические методы их обнаружения // Журн. анал. химии. 2005. Т. 60. № 12. С. 1239.
10. **Нужный В.П., Савчук С.А.** Токсичность алкогольных напитков и ацетона // Токсикологический вестник. 2005. № 6. С. 1.
11. **Вязьмина Н.А., Савчук С.А.** Применение методов газовой хроматографии для идентификации происхождения спирта // Журн. анал. химии. 2002. Т. 57. № 8. С. 813.
12. **Савчук С.А., Власов В.Н.** Идентификация винодельческой продукции методами высокоэффективной хроматографии и спектрометрии // Виноград и вино России. 2000. № 5. С. 5.
13. **Савчук С.А., Колесов Г.М.** Хроматографические методы в контроле качества коньяков и коньячных спиртов // Журн. анал. химии. 2005. Т. 60. № 8. С. 848.
14. **Савчук С.А., Колесов Г.М., Нужный В.П.** Исследование химического состава и потенциальной токсичности спиртов и спиртных напитков хроматографическими методами // Журн. анал. химии. 2007. Т. 62. № 6. С. 641.
15. **Нужный В.П., Савчук С.А., Каюмов Р.И.** Химико-токсикологическое исследование крепких алкогольных напитков домашнего изготовления (самогон из разных регионов России) // Наркология. 2002. № 5. С. 43.
16. **Савчук С.А., Кобелев К.В., Рыжова Т.П., Арбузов В.Н., Апполонова С.А., Симонов Е.А., Сорочкин В.И.** Применение новых хроматографических методов в исследовании пива // Пиво и напитки. 2003. № 1. С. 15.
17. **Savchuk S.A., Kolesov G.M., Nuzhnyi V.P.** Factors affecting the accuracy of the determination of diethyl phthalate in vodka, ethanol, and samples of illegal alcoholic products // J. Analyt. Chem. 2006. V. 61. № 12. P. 1198.
18. **Савчук С.А., Колесов Г.М.** Хроматографическое определение эфиров фталевых кислот как показателя фальсификации коньяков // Журн. анал. химии. 2007. Т. 62. № 8. С. 845.
19. **Нужный В.П., Савчук С.А., Тюрин И.А., Белов С.К.** Проблема денатурирующих добавок к этиловому спирту в связи с исследованием образцов нелегальной алкогольной продукции // Токсикологический вестник. 2004. май-июнь. С. 7.

Из результатов анализа различных спиртных напитков видно, что уровень фталатного загрязнения сравним у различных известных брендовых производителей пива, вин и коньяков. Этот уровень можно считать эталонным. В контексте приведенных данных нельзя считать наличие дибутилфталата в исследуемых образцах следствием их контакта с емкостями из пластмасс непищевого назначения. Поэтому необходимо законодательно ввести уровни пороговых значений для выявления реального загрязнения фталатами.

выставка IPhEB

ЦИФРОВОЕ БУДУЩЕЕ ФАРМАЦЕВТИКИ

02–04 апреля 2019
Санкт-Петербург

gotoipheb.com