



УДК 543.544

Определение этилендиаминтетрауксусной кислоты в майонезе методом ион-парной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Захарова А.М.¹, Гринштейн И.Л.¹, Карцова Л.А.², Потолицына В.Е.²¹ООО «Аналит», Санкт-Петербург²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 16.07.2013 г.

Аннотация

Методом ион-парной ОФ ВЭЖХ (ион-парный агент – гидроксид тетрабутиламмония) со спектрофотометрическим детектированием (255 нм) выявлено содержание этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в образцах майонеза. Извлечение ЭДТА проводили фосфатным буферным раствором (рН=7,5). Для спектрофотометрической регистрации получали комплекс ЭДТА с хлоридом железа (III).

Ключевые слова: ион-парная ОФ ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием, этилендиамин-тетрауксусная кислота, хлорид железа (III), майонез

Determination of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in the mayonnaise samples by ion-pair RP HPLC with spectrophotometric detection was investigated. Extraction of EDTA was performed with phosphate buffered solution (pH = 7.5). For spectrophotometric registration was prepared complex with ferric chloride (III). Chromatographic separation was performed on a reverse phase column in isocratic elution mode, in mobile phase was added to an ion-pair reagent - tetrabutylammonium hydroxide. Detection wavelength 255 nm.

Keywords: ion-pair RP HPLC with spectrophotometric detection, ethylenediaminetetraacetic acid, ferric chloride (III), mayonnaise

Введение

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и её натриевая соль широко применяются в химии, медицине, фармации, при производстве косметических средств в качестве комплексообразователей. ЭДТА относится к малотоксичным анализам; её главное свойство - образование устойчивых водорастворимых комплексов с ионами металлов, что снижает их окислительную активность. Связывая кальций и магний, ЭДТА делает воду мягкой, поэтому это соединение часто вводят в состав шампуней и стиральных порошков

В составе пищевых продуктов ЭДТА обеспечивает их длительное хранение, а также способствует стабилизации цвета и аромата.

Тем не менее постоянное употребление продуктов, содержащих ЭДТА, способствует связыванию важнейших микро- и макроэлементов (цинк, марганец, хром, ванадий, медь, молибден и, особенно, ионов кальция и железа), что может

привести к их дефициту в организме. Поэтому контроль за её содержанием в пищевых продуктах весьма актуален [1].

С 1 июля 2013 г. в России вводится «Технический регламент таможенного союза. Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств», регламентирующий содержание ЭДТА и её натриевой соли в майонезе – не более 75 мг/кг.

Традиционно содержание этого аналита в воде и других объектах определяют титриметрическим и/или фотометрическим методами [2, 3]. Использование обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) и спектрофотометрического детектора, наиболее распространенного в составе систем жидкостного хроматографа, может сделать метод определения ЭДТА общедоступным.

При этом существует ряд проблем.

Молекула определяемого вещества (рис. 1) не содержит хромофорных групп, поэтому для спектрофотометрического детектирования этого соединения необходимо получать соответствующие производные, поглощающие в УФ-свете.

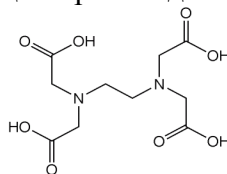


Рис. 1. Формула этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА)

В [4] для ВЭЖХ определения ЭДТА в субстанции *Меропенем* проводили предколонночную дериватизацию раствором хлорида железа в присутствии гидроксида натрия при нагревании на водяной бане (70 °С) в течение 20 мин.

Образующийся комплекс $\text{Na}[\text{Fe}-\text{ЭДТА}]$ не удерживается на гидрофобной неподвижной фазе C18, поскольку представляет собой соединение ионного характера. Для обеспечения его удерживания, в подвижную фазу добавляли ион-парный реагент - бромид тетрабутиламмония (элюирующая система: 5% метанола и 95% раствора, содержащего 0.7 г/л раствора бромид тетрабутиламмония и 4,6 г/л водного раствора ацетата натрия; pH 4.0; скорость подвижной фазы 1 мл/мин). Детектирование спектрофотометрическое ($\lambda=257$ нм).

Аналогичный подход к определению ЭДТА в сточной воде и безалкогольных напитках изложен в [5, 6]. Описано определение комплексов ЭДТА с железом в воде методом квадратноволновой вольтамперометрии [7]. Использование ионообменной хроматографии с МС-детектированием при определении в крови обсуждается в [8]. Перед хроматографическим разделением получали производные с сульфатом меди с последующим их разделением на ионообменной колонке Hamilton PRP X-100 (λ 254 нм).

Сравнительный анализ ЭДТА, S,S-этилендиаминодиянтарной кислоты и R,S-иминодиянтарной кислоты в креме для душа и пене для ванны проведен методами капиллярного электрофореза (КЭ) и ион-парной ОФ ВЭЖХ после получения комплексов с Fe(III) [9]. Метод ВЭЖХ обеспечил более низкий предел обнаружения (0,3 мкМ) по сравнению с КЭ (200 мкМ), однако время анализа в последнем случае меньше.

В [10] описано определение содержания ЭДТА в майонезе с использованием капиллярного зонного электрофореза и спектрофотометрического детектирования.

Целевой компонент извлекали из майонеза экстракцией водой, а затем получали производные с солью Fe(III). Предел обнаружения составил 3 мг/кг.

Эксперимент

Данная работа посвящена определению остаточного содержания ЭДТА в форме комплекса с Fe(III) в майонезе различных марок одного и того же производителя методом ион-парной ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Определение комплексов Fe-ЭДТА проводили на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence производства фирмы Shimadzu с детектором на диодной матрице ($\lambda=255$ нм) в изократическом режиме; колонка C18 Gravity (150 x 3 мм, 3 мкм; Macherey-Nagel; рабочий диапазон pH 1-11); подвижная фаза 20 мМ раствор KH_2PO_4 (pH=7,5) : ацетонитрил : 40%-ый водный раствор гидроксида тетрабутиламмония в соотношении, 90:10:0,2 (объемн). Скорость потока подвижной фазы 0,5 мл/мин.

Реагенты. Трилон Б (х.ч.) - динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), хлорид железа (III) (х.ч.), ацетонитрил (о.с.ч, Криохром), однозамещенный фосфат калия KH_2PO_4 (х.ч.), гидроксид тетрабутиламмония, 40%-ный раствор в воде (Sigma); гидроксид натрия (о.с.ч); вода бидистиллированная.

Методика выполнения эксперимента. Для приготовления градуировочных растворов использовали Трилон Б (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). 50 мг Трилона Б (точная навеска) помещали в колбу объемом 50 мл, растворяли в бидистиллированной воде и доводили до метки тем же растворителем (*раствор А*). Рассчитывали массу ЭДТА-составляющей в навеске трилона Б. Раствор А разбавляли в 100 раз (*раствор Б*). К 1 мл раствора Б добавляли 1 мл 0,1М раствора хлорида железа (III). Тщательно перемешивали и оставляли на 20 мин. при комнатной температуре для завершения процесса комплексообразования (*раствор В*) с получением комплекса $\text{Na}[\text{Fe}-\text{ЭДТА}]$ и последующим хроматографическим анализом. Аналогично готовились растворы и с другими концентрациями ЭДТА.

Выходные сигналы признавали приемлемыми при выполнении условий: СКО ≤ 3 % и коэффициент корреляции (R) не менее 0,995. Относительное среднеквадратичное отклонение (СКО) и коэффициент корреляции рассчитывали с помощью программного обеспечения LCsolution при установлении градуировочной характеристики.

Для извлечения ЭДТА из матрицы использовалась жидкостная экстракция фосфатным буферным раствором. Навеску майонеза (4 г) помещали в стеклянный стаканчик, добавляли 2 мл 20 мМ буферного раствора однозамещенного фосфата калия (pH 7.5). Для разделения водорастворимых компонентов майонеза и соединений, растворимых в органических растворителях, к образцу добавляли 10 мл хлороформа.

Пробу выдерживали в ультразвуковой ванне в течение 20 мин. Затем раствор центрифугировали в течение 5 мин (12000 об/мин). Водный слой отбирали с помощью шприца. Процедуру экстракции повторяли с новой порцией буферного раствора 2 мл. Экстракты объединяли и добавляли 4 мл 0.1 М раствора хлорида железа (III); тщательно перемешивали и оставляли на 20 мин при комнатной температуре. Затем отфильтровывали через нейлоновый мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и подвергали ВЭЖХ анализу.

Обсуждение результатов

Майонез – холодный соус, получаемый из смеси яичного желтка, растительного масла, лимонного сока или уксуса, соли, сахара и приправ. Промышленные майонезы могут включать в себя эмульгаторы, загустители, стабилизаторы, консерванты и различные вкусовые добавки.

Нашей задачей явилось количественное определение ЭДТА в трех образцах майонеза.

Извлечение целевого компонента из майонеза проводили фосфатным буферным раствором в ультразвуковой ванне в присутствии хлороформа. Попытки извлечения этого компонента водой либо водно-органическими системами приводили к невоспроизводимым результатам.

Оптимизировано время выдержки в ультразвуковой ванне. Установлено, что за 20 мин достигается полное извлечение ЭДТА из майонеза (рис. 2).

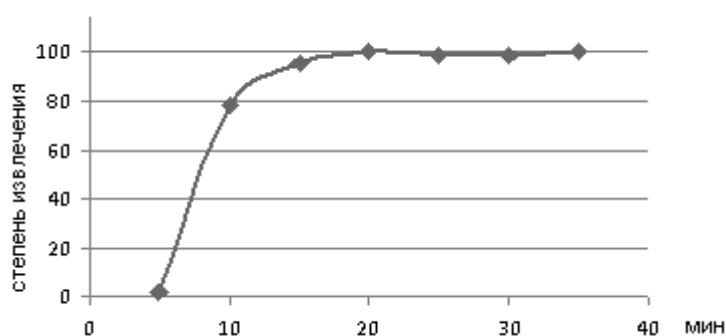


Рис. 2. Зависимость степени извлечения ЭДТА из майонеза от времени экстракции в УЗ-ванне

Для спектрофотометрической регистрации получали комплексное соединение ЭДТА с хлоридом железа (III).

Схема образования соответствующего комплексного соединения представлена на рис. 3.

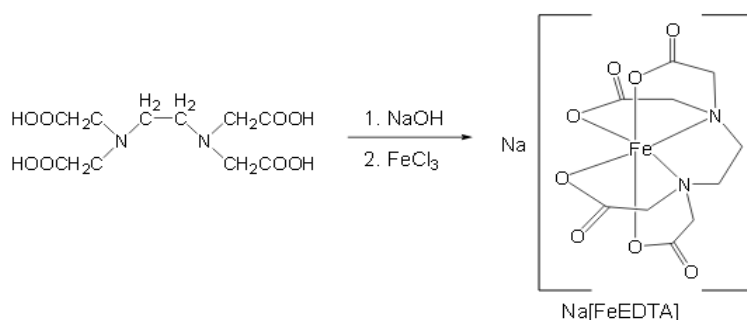


Рис. 3. Схема образования комплекса Na[FeEDTA]

Процедуру приготовления комплекса Fe-ЭДТА с использованием градуировочного раствора В и 0,1М раствора хлорида железа (III), а также для растворов с различными концентрациями ЭДТА (0,1; 0,02; 0,01; 0,001 мг/мл), повторяли пять раз (СКО площадей пиков, полученных для $n=5$, < 0,7%).

Пример спектра поглощения комплекса Fe-ЭДТА представлен на рис. 4.

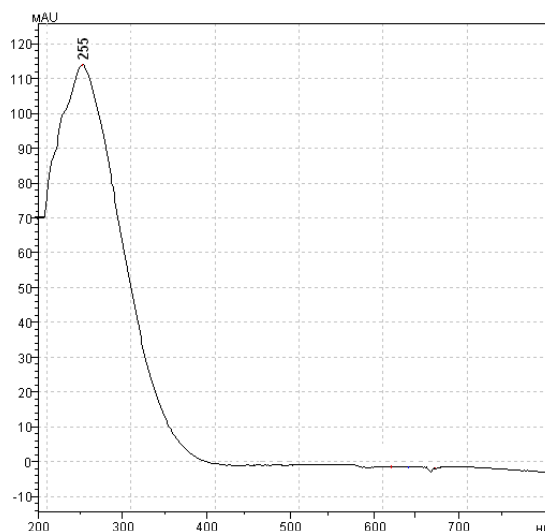


Рис. 4. Спектр поглощения комплекса Fe-ЭДТА

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке с обращенной фазой (C18) в условиях ион-парной хроматографии. Примеры соответствующих хроматограмм различных проб майонеза (образец №1, №3) представлены на рис. 5 а, б.

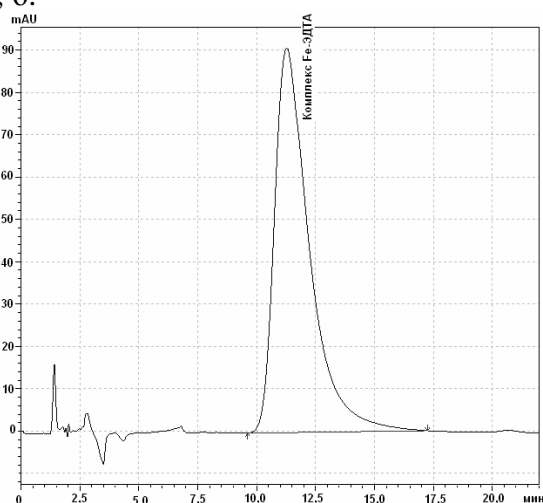


Рис. 5а. Хроматограмма подготовленного образца майонеза №1

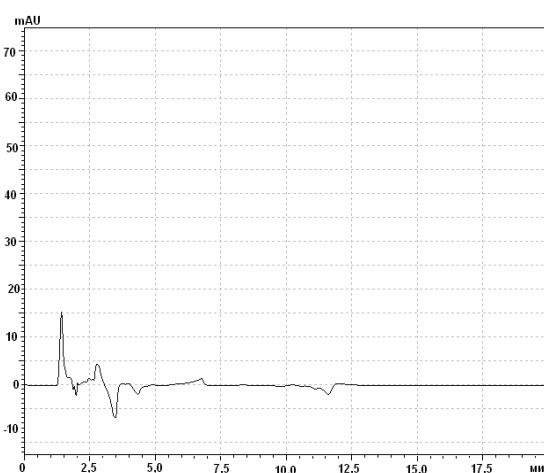


Рис. 5б. Хроматограмма образца майонеза №3

Условия анализа: хроматограф Shimadzu LC-20, УФ-детектирование ($\lambda=255$ нм), колонка Macherey-Nagel C18 Gravity (150 x 3 мм, 3 мкм), подвижная фаза: 20 mM раствор KH_2PO_4 (pH=7,5) : ацетонитрил : 40% водный раствор гидроксида тетрабутиламония, 90 : 10: 0,2 (% объемн.), $V_{\text{потока}}$ 0,5 мл/мин, $T_{\text{колонки}}$ 40 °C

Таблица 1. Результаты определения ЭДТА в образцах майонеза

	Образец №1, мг/кг, n=2	Образец №2, мг/кг, n=2	Образец №3, мг/кг, n=2
Массовая доля ЭДТА	360±13	480±4	<0.005

Результаты определения ЭДТА в трех различных образцах майонеза представлены в табл.1. Достигнутый предел обнаружения ЭДТА (0,005 мг/кг) существенно ниже, чем [2-10].

Таким образом, в двух исследованных образцах ЭДТА содержалась в довольно значительных количествах, в одном из образцов этот компонент не обнаружен.

Заключение

Предложен способ количественного определения этилендиаминтетрауксусной кислоты в майонезе методом ион-парной ОФ ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием, включающий экстракцию целевого компонента фосфатным буферным раствором в присутствии хлороформа, образование комплекса с хлоридом железа (III) и ВЭЖХ-анализ ($\lambda = 255$ нм, 40 °С, изократический режим элюирования).

Список литературы

1. Люк Э., Ягер М. Консерванты в пищевой промышленности. С.-Петербург: Гиорд, 1998. 254 с.
2. Gaal F.F., Abramovich B.F. Determination of EDTA by catalytic amperometric and catalytic potentiometric titration at a small constant current // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 1977. V. 286. № 3. P. 222.
3. ОСТ 34-70-953.19-91. Воды производственных тепловых электростанций. Методы определения ЭДТА и её солей. Москва, 1991. 11 с.
4. Bhavil N. et al. A Validated Reverse Phase HPLC Method for the Determination of Disodium EDTA in Meropenem Drug Substance with UV-Detection using Precolumn Derivatization Technique // *Anal Chem Insights*. 2011. V. 6. P. 7–14.
5. Water. Xie C. Z. et al. Determination of EDTA in Dairy Wastewater and Adjacent Surface // *International Journal of Civil and Environmental Engineering*. 2010. V. 2. N 1. P. 44-48.
6. Cagnasso C. E. et al. Development and validation of a method for the determination of EDTA in non-alcoholic drinks by HPLC // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007. V. 20. P. 248–251.
7. Zhao C. et al. Determination of EDTA species in water by square-wave voltammetry using a chitosan-coated glassy carbon electrode // *Water Research*. 2003. V. 37. P. 4270–4274.
8. Miller M. L. et al. The analysis of EDTA in dried bloodstains by electrospray LC-MS-MS and ion chromatography // *Journal of analytical toxicology*. 1997. V. 21. P. 521-528.
9. Katata L., Nagaraju V., Crouch A.M. Determination of ethylenediaminetetraacetic acid, ethylenediaminedisuccinic acid and iminodisuccinic acid in cosmetic products by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography // *Analytica Chimica Acta*. 2006. V. 579. P. 177–184.
10. Kvasnicka F., Mikova K. Determination of EDTA in Mayonnaise by On-Line Coupled Capillary Isotachopheresis–Capillary Zone Electrophoresis with UV Detection // *J. of Food Composition and Analysis*. 1996. V. 9. N 3. P. 231-242.

Карцова Людмила Алексеевна - д.х.н. профессор кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, тел. (812) 428-40-44

Kartsova Ludmila A. - Dr.Sc.Chem. the professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg, e-mail: kartsova@gmail.com

Гринштейн Илья Львович – к.х.н. руководитель группы компаний «АНАЛИТ», член Научного Совета РАН по аналитической химии, Санкт-Петербург, тел. (812) 325-55-02

Захарова Анна Михайловна - аспирант кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета, инженер-химик лаборатории ООО «Аналит Продактс» , Санкт-Петербург, тел. (812) 320-69-17

Потолицына Вера Евгеньевна - аспирант кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Grinshein Pia L. - Cand.Sc. Chem., head of the Analit group, member of RAS Analytical Chemistry Scientific Committee, St. Petersburg, e-mail: grin@analit-spb.ru

Zaharova Anna M. - the post-graduate student of analytical chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, engineer of Analytical Laboratory Analyt Ltd St. Petersburg, St. Petersburg, e-mail: za@analit-spb.ru

Potolitsyna Vera E. - the post-graduate student of analytical chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, , St. Petersburg, e-mail: potolitsynavera@gmail.com