Определение качественного и количественного содержания лёгкой и тяжёлой фракций алифатических и ароматических углеводородов (MOSH/MOAH) в тропических маслах с применением комплексной аналитической системы ВЭЖХ-ГХ/МС «Маэстро-αМС»

А.В. Шахов[1], И.Е.Конопляник[1]., Д.А. Колунтаев[2]
1 – ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты», г. Алексеевка, Белгородская область, Россия.
2 - ООО «Сайтегра», Московская область, г. Красногорск, Россия Koluntaev@gmail.com

1. Введение

В июле 2016 года правительством РФ был подписан документ «Стратегия повышения качества пищевой продукции до 2030 года». Целью данного документа является, как поддержание на прилавках только качественных товаров и продуктов питания, так и выполнение контроля за качеством ингредиентов, различных добавок, пищевых составляющих в продукции непосредственно на стадии её производства. Всё это, так или иначе, требует от крупных производителей развития собственных контрольных лабораторий и лабораторий инновационных исследований, что позволило бы поддерживать производственные площадки современными аналитическими и методическими решениями контроля качества и безопасности производимой продукции.

Масс-спектрометрия является многоцелевым методом, используемым в области безопасности пищевой продукции, который позволяет одновременно контролировать содержание множества групп различных органических соединений на уровне сверхнизких концентраций в одной пробе. Технологический прогресс в аналитическом приборостроение привёл к снижению возможного порога чувствительности масс-спектрометрических систем, что в свою очередь способствует появлению новых задач контроля в продуктовом секторе. Одна из таких задач - контроль содержания углеводородных фракций минеральных масел (MOH, mineral oil hydrocarbons) в пищевой продукции, которая в настоящее время становится широко-обсуждаемой темой во всём мире [1].

Углеводороды минеральных масел представляют собой комплекс химических соединений, состоящий из двух структурно несопоставимых фракций: фракция алифатических углеводородов минерального масла (MOSH, mineral oil saturated hydrocarbons) и фракция ароматических углеводородов (MOAH, mineral oil aromatic hydrocarbons). (рис 1). В 2012 году [2] эксперты Европейского агентства по безопасности пищевой продукции (EFSA) вынесли научное заключение о том, что углеводороды минеральных масел являются потенциальными канцерогенами и их уровень в продуктах по возможности должен контролироваться. В настоящее же время проводятся общественные консультации по проекту научного заключения об углеводородных рисках присутствия нефтепродуктов в еде [3]. При этом, согласно немногочисленным литературным данным, потенциальное воздействие на здоровье человека различных фракций минерального масла также существенно различается [2]. Наиболее опасным признаётся присутствие ароматических углеводородов (MOAH), которые могут действовать как генотоксичные канцерогены [2], в то время как минеральные масла с насыщенными углеводородами (MOSH) предположительно могут накапливаться в тканях человека, но на данный момент нет чёткого мнения об их опасности воздействия через пищу на здоровье человека.

Алифатических углеводороды (MOSH) | *Ароматических углеводороды (MOAH)*

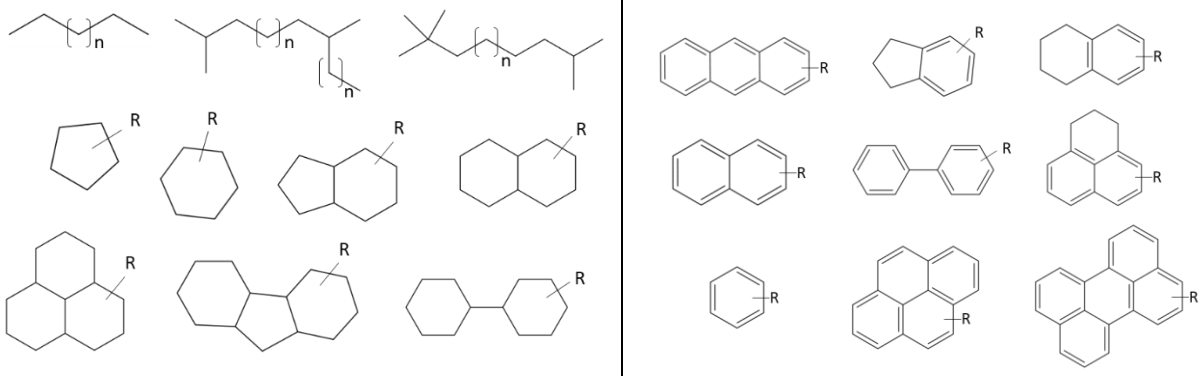


Рис. 1. Примеры структурных формул некоторых МОН. *Слева* алифатические углеводороды (MOSH), относительная доля подобной фракции в минеральных маслах от 75 до 85%. *Справа* ароматические углеводороды (MOAH), относительная доля фракции в минеральных маслах от 15 до 25% (в основном от 1 до 5 колец).

Впервые миграция компонентов минерального масла в продукты питания была обнаружена в ходе исследований, проведённых в лаборатории Цюриха (Швейцария) [4]. На тот момент причиной подобной миграции был признан картон, который был изготовлен из макулатуры, содержащей типографскую краску на основе минерального масла. Поэтому первоначально контроль содержания углеводородов требовался только к сухим кормам, расфасованным непосредственно в картон или бумагу, и продуктам, имеющим большую площадь соприкосновения с упаковкой (рис, мука, лапша и др.). Позже компоненты минерального масла были обнаружены и в не упакованных продуктах, в частности, в яйцах, рыбе, мясных изделиях, в растительных маслах, шоколаде, хлебобулочных изделиях. Такое наблюдение привело к выводам, что углеводороды минеральных масел наиболее вероятно могут проникать в пищевые продукты либо в результате загрязнения смазочными маслами в ходе уборочных работ, либо их транспортировке, или же от механизмов при производстве продуктов питания.

Стоит отметить, что методические подходы к анализу остаточных количеств минеральных масел в пищевой продукции за последние несколько лет постоянно совершенствуются. В литературе до сих пор можно встретить множество интересных статьей, которые по-разному трактуют результаты исследований, а также предлагают свои наработки в подходах к экстракции целевых фракций и расчётах их содержаний. Первый же международный стандарт для пищевой промышленности был выпущен в 2015 году и метод был основан на предварительном разделении фракций с помощью стеклянной препаративной колонки, заполненной смешанным активированным сорбентом, с последующим извлечением фракций различными растворителями. Подобный метод позволил достигать предела количественного обнаружения углеводородов на уровне 50 мг/кг продукции (*ISO 17780*). В 2017 году был предложен более простой и быстрый *«on-line»* метод экстракции и анализа углеводородов минеральных масел (EN 16995:2017-08). Идея метода заключается в применении высокоэффективной жидкостной хроматографии (*далее ВЭЖХ*) для надёжного разделения фракций алифатических углеводородов от фракции ароматических углеводородов с последующим газохроматографическим анализом каждой фракции. В декабре 2020 года Немецким обществом изучения жиров был усовершенствован *«on-line»* метод (DGF C-VI 22 (20)), что позволило достигать предела количественного определения целевых фракций углеводородов минерального масла ниже 1 мг/кг в маслах и жирах [4].

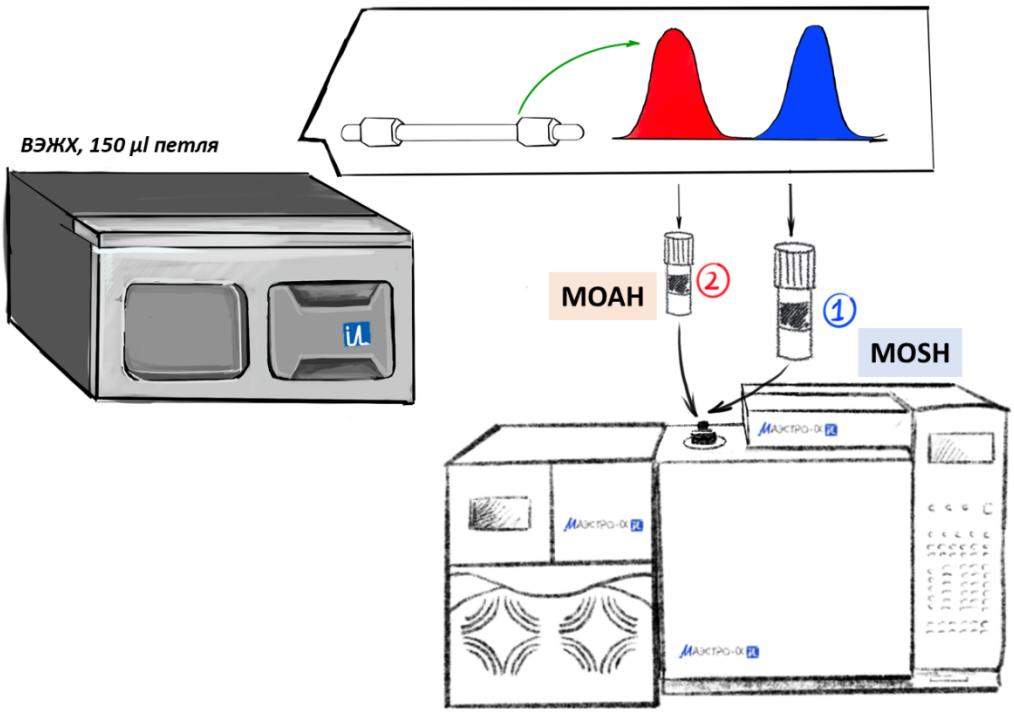


Рис. 2. Модельная схема работы *«on-line»* метода экстракции и анализа углеводородов минеральных масел.
Прим. *Подобная схема была также использована для выполнения настоящей работы.*

На мировом рынке растительных масел тропические масла (пальмовое, пальмоядровое, кокосовое) занимают одно из главных мест наряду с соевым, подсолнечным и рапсовым маслами. Такие масла традиционно используются и уже стали неотъемлемой частью сырьевой базы в пищевой промышленности: заменителей масла какао, молочного жира и других жиров специального назначения, спредов, маргариновой продукции. Очевидно, что рынок пальмового масла в России динамично развивается и будет только расти, но при этом возникают сложности в контроле качества такой продукции. [5] Удалённость стран импортёров тропических масел (Малайзия и Индонезия[1]) обуславливает необходимость в их транспортировке либо по воде в танкерах, либо же в железнодорожных цистернах. При этом данный вид масел чаще всего транспортируется наливом непосредственно в отсеки, что требует от поставщика добросовестного подхода к их чистоте. Всё это может неминуемо приводить к загрязнению продукции минеральными маслами и поэтому подобный вид продукции должен контролироваться ещё на стадии ввода сырья на производство.

Настоящая работа представляет собой готовое инновационное решение по определению качественного и количественного содержания лёгкой и тяжёлой фракций алифатических и ароматических углеводородов (MOSH/MOAH) минеральных масел в растительным масле тропического происхождения с применением комплекса отечественной хромато-масс-спектрометрической системы ВЭЖХ-ГХ/МС «Маэстро-αМС» (производство ООО «Интерлаб», Россия) с вводом пробы в температурно-программируемый испаритель (Gerstel, Германия). Работа выполнена совместно с отделом Инновационных исследований ООО «ЭФКО Пищевые ингредиенты».

[1] *В сумме занимают более 2/3 всего рынка.*

2. Экспериментальная часть

К исследованию были приняты два образца тропического масла: *пальмовое масло* и *кокосовое масло*. Масла предварительно растапливали до температуры 5 – 10^0C выше температуры плавления.

Для определения MOSH взвешивали 2,0 г с точностью ± 0,1 г образца и добавляли раствор внутреннего стандарта тетрадекана. Мешающие триглицериды, диглицериды жирных кислот убирали из состава образца путём омыления с последующей экстракцией неомыляемой фракции пертолейным эфиром. Процесс омыления проводили с применением калия гидроокиси (KOH) в спиртовой среде при температуре 80°C, контроль отсутствия мыл жирных кислот в пертолейном экстракте контролировали по отсутствию изменения цвета индикатора фенолфталеина.

Стоит отметить, что корректному количественному определению ароматических углеводородов, мешают содержащиеся в образце масел природные олефины (*сквален, каротины, стерины*). Физически исключить подобные соединения из образца без существенной потери целевой MOAH фракции невозможно, поэтому использовали подход, основанный на изменении времени элюирования олефинов с хроматографической ВЭЖХ колонки. Для этого использовали принцип эпоксидирования двойных связей молекул алкенов до оксиранов с помощью 3-хлорпероксибензойной кислоты (mCPBA).

В результате из подготовленного экстракта масла для MOSH и экстракта MOAH выделили последовательно целевые аналиты MOSH и MOAH с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (рис. 2).

2.1. Сбор фракций с помощью ВЭЖХ системы

Для сбора фракций алифатических (MOSH) и ароматических (MOAH) углеводородов использовали компактный высокоэффективный жидкостной хроматограф «Близар» (производство ООО «Интерлаб», Россия). Образец вводили в хроматографическую колонку, наполненную силикагелем (*Silica gel 60A (Sigma-Aldrich) (250 x 2,1мм)*), с помощью дозирующей петли объемом 150 мкл при постоянном поддержании температуры колонки 30°C. В качестве элюента использовали петролейный эфир (элюент А) и дихлорметан (элюент Б). Соотношение элюента в колонке программировали по следующей схеме: от 0 мин до 2,5 мин 100% элюент А; с 2,6 мин до 12 мин смешивали до 35% элюента Б; далее с 12,1 мин и до конца анализа 100% элюента Б. Двухплунжерный насос хроматографа обеспечивал необходимый стабильный поток элюента через хроматографическую колонку со скоростью 0,3 мл/мин. Перед последующим вводом новой пробы хроматографическую колонку промывали элюентом Б (100%) в течение 15 мин с последующим переключением на элюент А (100%) и ожиданием стабилизации давления в колонке (в течение 10 минут) при скорости потока 1,0 мл/мин.

Полноту разделения фракций в хроматографической колонке контролировали с помощью временных маркёров, которые заранее вносили в пробу. В частности, *холестан* (Cho), использовали в роли маркера окончания элюирования алифатических углеводородов; *1-метилнафтален* (1-MN) использовали как маркер начала выхода фракций ароматических углеводородов; *перилен* (Per) использовали, как маркер элюирования алифатических углеводородов с хроматографической колонки ВЭЖХ. Как итог, программа сбора фракций имела следующие временные окна: с 1,1 минуты по 2,5 минуты от ввода пробы выполняли сбор фракции MOSH; с 6,5 мин до 7,5 мин собирали MOAH.

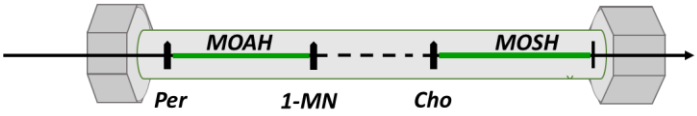


Рис. 3. Последовательность элюирования фракций минерального масла с ВЭЖХ колонки.

В качестве внутренних стандартов для количественного расчёта содержания фракций использовали следующие аналитические стандарты:

- *тетрадекан* - для расчёта количественного содержания алифатических углеводородов,
- *2-метилнафтелен* - для расчёта количественного содержания ароматических углеводородов.

Все используемые в исследовании реагенты имели классификацию, как особо чистые или марку качества «HPLC grade», стандартные вещества имели чистоту не менее 97%. Для идентификации фракции MOSH использовали смесь стандартов алканов C10, C20-C40 (кат. № 94234 Sigma Aldrich), гексадекан, октадекан, тетракозан и пентаконтан, все квалификации ХЧ. Для идентификации фракции MOAH использовали аналитические стандарты 2-метилнафтален, н-пентилбензен и трифенилен.

2.2. Анализ фракций с помощью ГХ-МС системы

Элюат каждой фракции углеводородов вводили в испаритель с программируемым нагревом (*PTV*) и анализировали с помощью хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC. Применение подобного типа испарителей обеспечивало возможность ввода повышенного объёма пробы (*до 50 мкл*) и дополнительного концентрирования пробы непосредственно внутри самой аналитической системы за счёт быстрого удаления растворителя пробы ещё до момента старта анализа. Такой подход позволяет, как исключить возможные искажения интенсивностей для легколетучих соединений в пробе, так и повысить чувствительность аналитического метода, что особенно важно при анализе следовых концентраций целевых фракций. Условия работы хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC, а также программа работы испарителя хроматографа представлены в таблице 1.

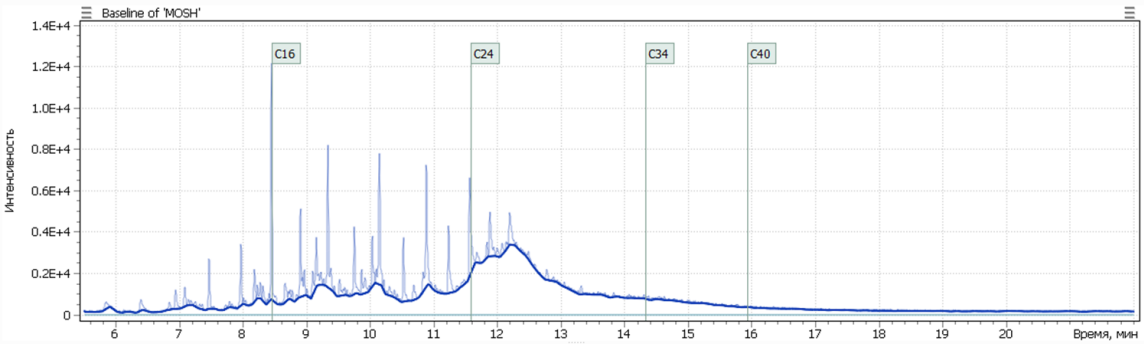
Табл. 1. *Режимы работы хромато-масс-спектрометрической системы*

Параметры	**Режимы работы**
Хроматографическая колонка	DP-5HT (30 x 0,25 x 0,1), арт.: 122-5731 (Agilent)
Тип испарителя	Программируемый нагрев, PTV (Gerstel, Германия) с режимом LVI (ввод большого объема).
Объём инжектируемой пробы	10 мкл
Режим работы испарителя в момент ввода пробы	Splitless (без деления пробы); время работы режима 3,0 мин, далее 50 мл/мин
Программа нагрева испарителя в момент ввода пробы	40°C - 0,35 мин; 12°C/сек до 70°C - 1,7 мин 12°C/сек до 300°C - 5 мин.
Градиент температуры печи	40°C/мин – 2,0 мин; 25°C/мин до 350°C – 7,6 мин
Тип и скорость газ-носителя	(гелий) 1.0 мл/мин
Температура интерфейса МС	300°C
Температура ионного источника	280°C
Режима работы и диапазон сканирования МСД	SCAN: 50 – 400 Да (2000 Да/сек)
Время задержки на выход растворителя	5,5 мин

2.3. Применение специализированного пакета программного обеспечения

Получаемый сигнал на хроматограмме полного ионного тока образца представляет собой неразрешённый изобарный кластер (рис. 4), который в последствии необходимо проинтегрировать и соотнести его площадь с площадью внутреннего стандарта. Для выполнения такой задачи использовали специализированный пакет алгоритмов в программном обеспечении Маэстро-Аналитик, разработанный специально для работы с подобными видами сигналов и поставляемый совместно с комплексом ВЭЖХ-ГХ-МС Маэстро-αМС.

Сложность обработки подобного рода сигналов заключается в первоначальном выделении области сигнала целевой фракций углеводородов, исключение всех мешающих пиков на вершине углеводородного кластера и последующее количественное вычисление полученной площади. При этом EFSA опубликовало заключение, в котором рекомендуется при расчёте уделять особое внимание углеводородному диапазону с составом от C16 до C35. Предполагается, что углеводороды в таком диапазоне наиболее активно проявляют свои токсикологические свойства. Подобные требования предполагают наличие возможности в программном обеспечении дополнительного сегментирования площади фракций и количественного определения каждой фракции отдельно. На рисунке 4 представлена возможность выполнения всех требований в программном обеспечении Маэстро-Аналитик для работы с MOSH/MOAH сигналами.



Прим.: Профиль кластера алифатических углеводородов минерального масла (общий вид)

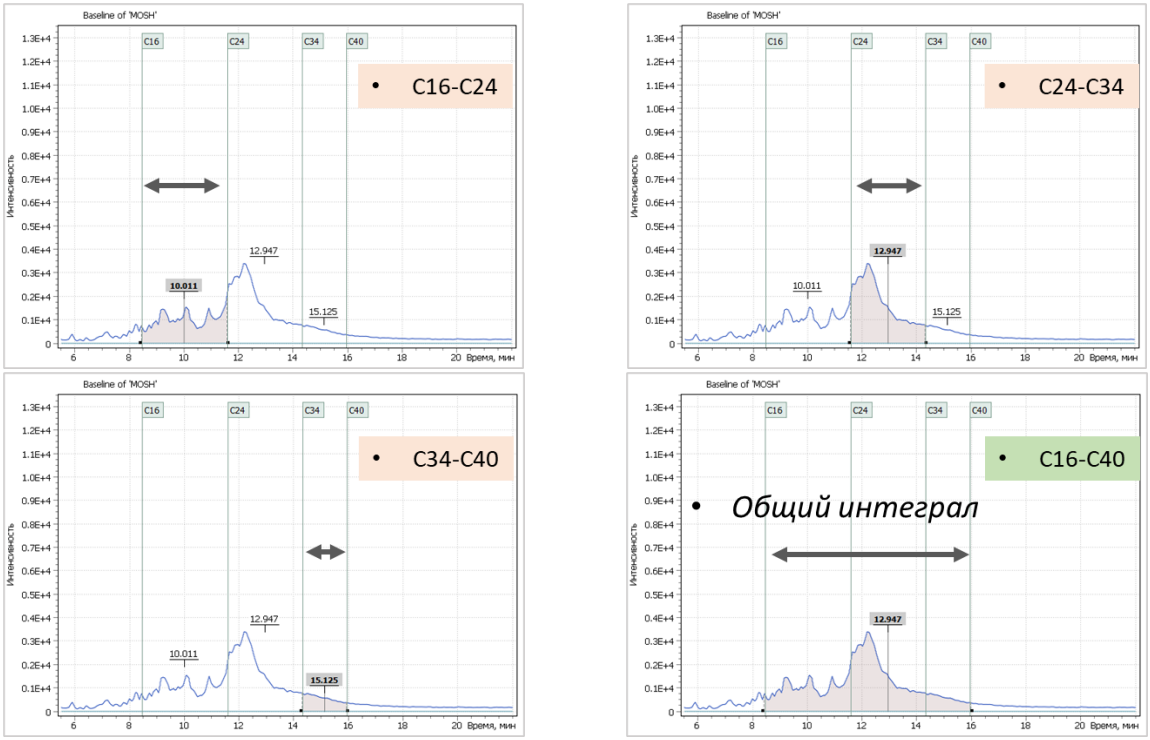


Рис. 4. Пример детального сегментирования кластера алифатических углеводородов минерального масла с помощью программного обеспечения Маэстро-Аналитик *(**Прим**. Пакет обработки доступен начиная с вер. 1.027)*.

3. Результаты и обсуждения

Результаты исследований углеводородных фракций в рабочем образце пальмового масла представлены на рисунке 5. Согласно проведённым исследованиям, количественное содержание алифатических углеводородов составило 14,43 мг/кг пробы, содержание фракции ароматических углеводородов - 0,64 мг/кг.

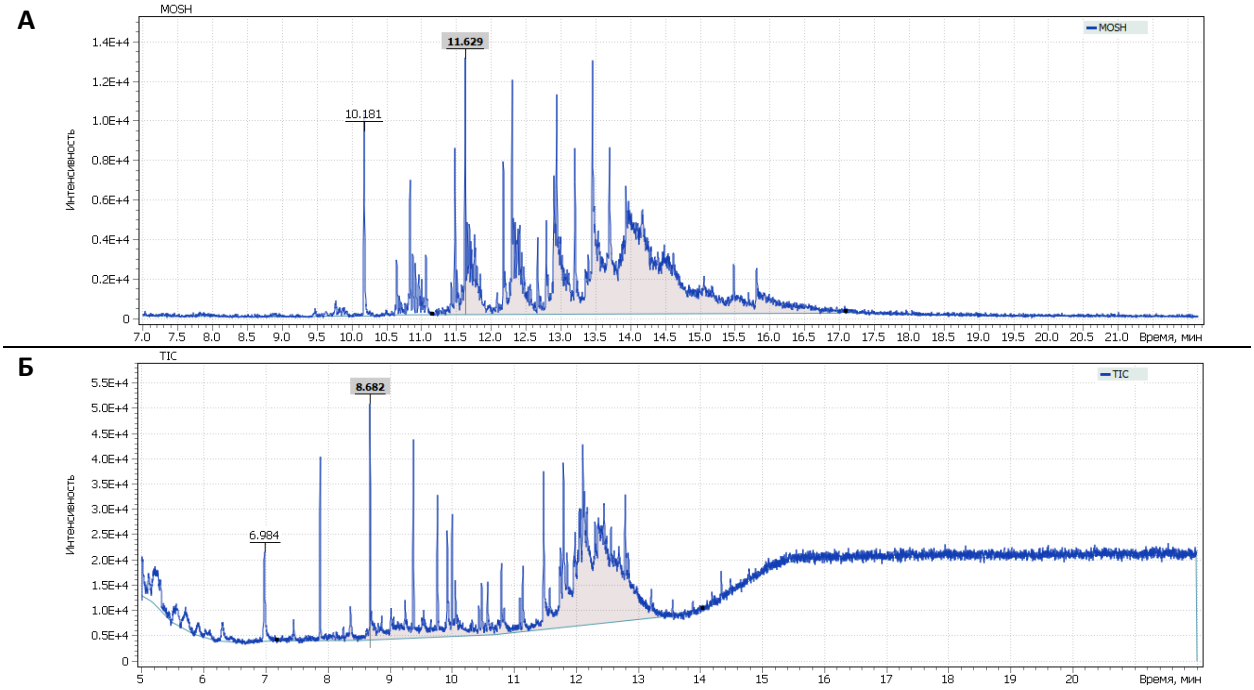


Рис. 5. Профиль сигналов MOSH (А) и МОАН (Б) в рабочем образце пальмового масла.

Контроль качества выполнения экстракции углеводородов, а также подтверждение отсутствия мешающих сигналов из чистого растворителя, ежедневно выполняли с помощью приготовления холостой пробы. На рисунке 6 представлена суммарная хроматограмма двух фракций алифатических углеводородов в пальмовом масле *(синий профиль)*, а также в чистом растворителе петролейного эфира *(красный профиль)*. На рисунке также наглядно представлена корректность процедуры экстракции и область алифатических углеводородов, которая должна быть принята к расчёту.

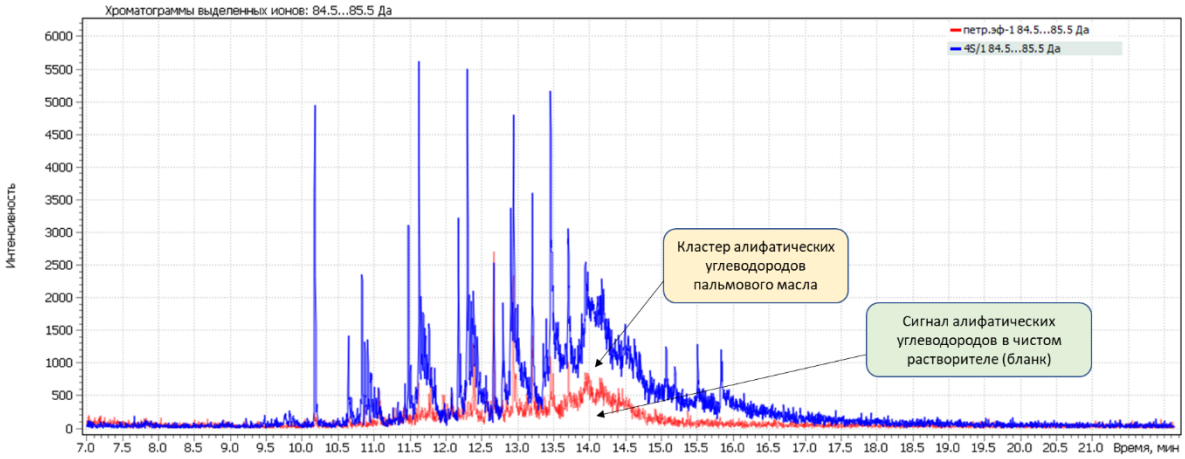


Рис. 6. Суммарная хроматограмма сигнала алифатических углеводородов чистого петролейного эфира *(красный профиль)* и в образце пальмового масла *(синий профиль)*.

На рисунке 7 представлены хроматограммы фракций алифатических и ароматических углеводородов в образце кокосового масла. Содержание MOSH в образце составило 16,79 мг/кг, фракции MOAH 0,12 мг/кг.

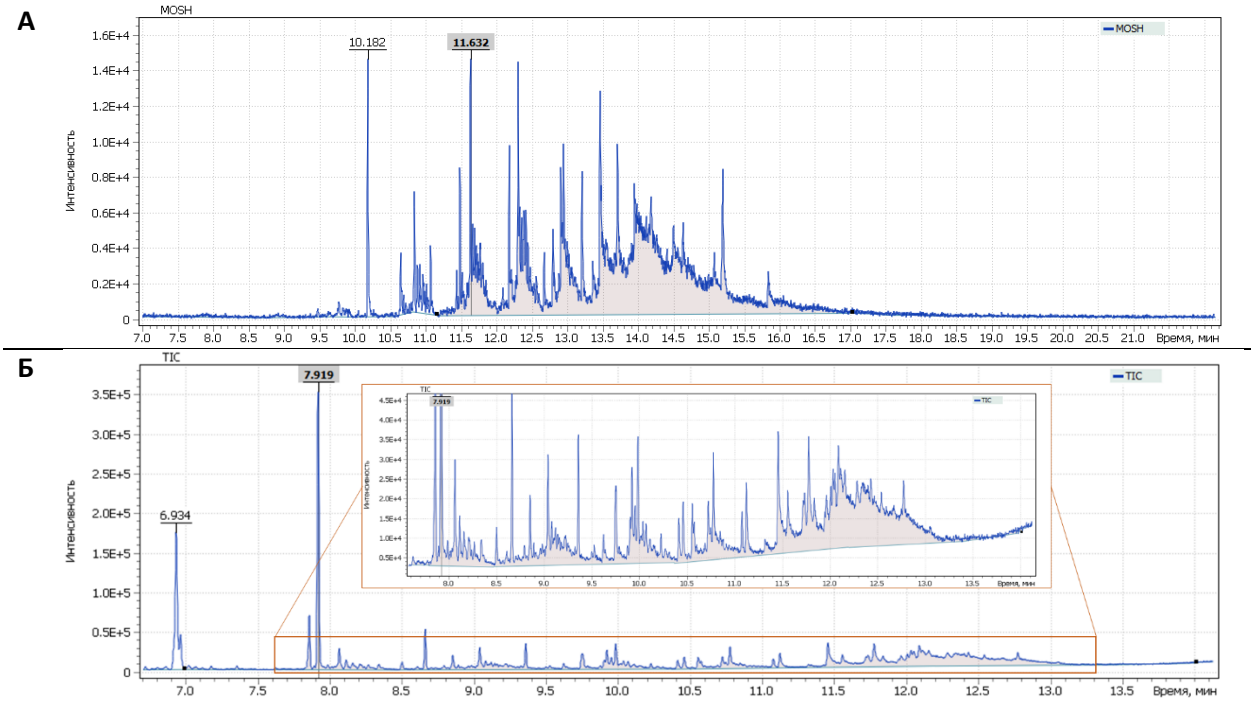


Рис. 7. Профиль сигналов MOSH (А) и MOAH (Б) в образце кокосового масла.

Стоит также отметить, что некоторые вещества-маркёры могут предоставить дополнительную информацию и о возможном источнике загрязнения минеральными маслами. Как пример - детектирование следовых количеств *ди-изо-пропил-нафталины* (DIPN) в образце, которое представляет собой соединение, используемое в качестве растворителя в копировальной бумаге, и который невозможно полностью удалить при производстве макулатуры. Таким образом, обнаружение DIPN в пищевых продуктах может указывать на прямой или косвенный контакт продукции с загрязнённым упаковочным материалом. Всё это в свою очередь позволяет контролировать добросовестность поставщика продукции.

В таблице 2 представлена метрологическая оценка параметров методики. В ходе сбора данных выполняли серию анализов из 10 определений результатов испытаний. По полученным данным рассчитывали статистическую погрешность результатов в серии.

Табл. 2. *Статистическая погрешность результатов MOSH в серии из 10 определений*

№ п/п	Результат MOSH, мг/кг	Хср	СКО метода, мг/кг	Предел повторяемости (r), мг/кг	Предел повторяемости (r), %
1	12,45	13,3	0,61	1,8	13,2
2	12,47				
3	13,38				
4	13,47				
5	13,11				
6	13,54				
7	13,89				
8	14,25				
9	12,56				
10	13,45				

Как видно из таблицы 2, полученные результаты между собой согласуются, что дает основание говорить о сходимости результатов повторных анализов с принятой доверительной вероятностью. Таким образом, относительная ошибка определения алифатических углеводородов минеральных масел в жирах не превышает 13,2%.

В исследуемых образцах содержание ароматических углеводородов было в следовых количествах и определение метрологической оценки параметров методики на данный момент пока не представляется возможным. Метод добавки минерального масла к испытуемому образцу не дает гарантированного количественного определения, так как нет достоверной информации по содержанию ароматических углеводородов в минеральном масле. Ведется работа по данному направлению.

4. Выводы

Применение масс-спектрометрической системы для определения качественного и количественного содержания лёгкой и тяжёлой фракций алифатических и ароматических углеводородов (MOSH/MOAH) в тропических маслах позволяет более детально распознавать «природу» углеводородного сигнала. Позволяет оценивать чистоту внутреннего стандарта на отсутствие интерферирующих соединений в его профиле за счёт построения сигналов структурно-характеристических ионов. Представленный метод симбиоза двух хроматографических технологий ВЭЖХ и ГХ/МС может быть использован, как надёжный метод, позволяющий количественно определить MOSH/MOAH, а также использоваться и как дополнение к существующему подходу ВЭЖХ-ГХ/ПИД (EN 16995:2017-08)

Подобный мониторинг позволит лучше понимать опасность присутствия в продовольственных товарах и проникновения в организм человека с пищей минеральных масел с насыщенными углеводородами и минеральных масел с ароматическими углеводородами, которые являются основными причинами воздействия рациона.

5. Список литературы

1. Weber S, Schrag K, Mildau G, Kuballa T, Walch SG, Lachenmeier DW. Analytical Methods for the Determination of Mineral Oil Saturated Hydrocarbons (MOSH) and Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons (MOAH)—A Short Review. *Analytical Chemistry Insights*. 2018;13. doi:10.1177/1177390118777757

2. EFSA Journal 2012;10(6):2704 'Mineral oil hydrocarbons in food'

3. *https://connect.efsa.europa.eu/RM/s/publicconsultation2/a0l09000006qqHf/pc0400*

4. M. Biedermann, A. Eicher, T. Altherr et al./ Quantification of mineral oil aromatic hydrocarbons by number of aromatic rings via comprehensive two-dimensional gas chromatography: First results in food, Journal of Chromatography Open, Volume 2, 2022, 100072, ISSN 2772-3917, https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2022.100072.

5. «Современные тенденции развития производства жировых продуктов: наука, технологии, бизнес»// под ред. В.А. Тутельяна, А.П. Нечаева. — М.: СППИ, 2016. — 424 с