APP NOTE-11/2019GCMS



Применение газового хроматографа с масс-спектрометрическим детектированием **Маэстро-αMC** в целях подтверждения детектирования в молочных продуктах растительных масел и жиров на растительной основе по наличию фитостеринов.

Колунтаев Д. А*. к. б. н., научный сотрудник отдела исследований и разработок,*
ООО Интерлаб*, Россия, Москва*

Ключевые слова
Газовая хромато-масс-спектрометрия, фитостерины, молочная продукция, инертный источник ионизации, режим сканирования SCAN

Резюме

Продемонстрирована возможность и надёжность применения хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC для подтверждения детектирования в молочных продуктах растительных масел и жиров на растительной основе по наличию фитостеринов.

Введение

Проблема фальсификации и контроля качества молока и молочной продукции заслуживает самого пристального внимания как надзорных органов, так и испытательных лабораторий, занимающихся исследованиями данной продукции. Особенное значение сегодня имеют идентификация молочной продукции, то есть подтверждение её натуральности, соответствие состава продукта надписям на этикете, отсутствие дополнительных, несвойственных молочным жирам сырьевых компонентов, а также соотношение заявляемого качества продукта и его цены.

Наиболее распространена фальсификация молочных продуктов путём изменения их натурального состава при введении вредных, а иногда и опасных для здоровья компонентов. Некоторые производители подчас максимально удешевляют себестоимость продукта, заменяя натуральные молочные жиры растительными – пальмовым, соевым и другими маслами, которые намного дешевле [1].

Обнаружение в молочных продуктах растительных масел и жиров на растительной основе традиционно осуществляется методом газовой хроматографии при определении растительных стеринов и массовой доли метиловых эфиров жирных кислот. В частности, ГОСТ 31979-2012 «Молоко и молочные продукты. Метод обнаружения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стеринов» предусматривает использование газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором. Безусловно данный метод является рутинным и наиболее простым в исполнении, позволяющим проводить необходимые количественные вычисления присутствия целевых компонентов. Однако данный метод имеет ряд существенных недостатков, которые могут быть сведены к минимуму за счёт использования масс-спектрометрического детектора, как подтверждающего инструмента:

а) масс-спектрометрия вводит дополнительный признак подтверждения (кроме времени элюирования), а именно масс-спектр в режиме сканирования заданного массового диапазона, а также детектирование корректного отношения ионных токов целевых фрагментов в режиме сканирования выделенных ионных токов искомых соединений.

б) второй существенный недостаток метода с пламенно-ионизационным детектированием – метод основан на процедуре осаждения стеринов с использованием спиртового раствора дорогостоящего реагента дигитонина. Введённый в действие в 2016 году ГОСТ 33490-2015 «Молоко и молочная продукция. Обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием» устраняет этот недостаток, т.к. не требует использования дигитонина.

В настоящей статье представлена возможность современного и надёжного газового хроматографа с масс-спектрометрическим детектированием МАЭСТРО-αMC собственного производства ООО «Интерлаб» (Россия) успешно реализовывать данный метод, а также демонстрировать стабильность работы в условиях рутинной загрузки.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Все используемые в эксперименте реагенты имели классификацию, как особо чистые или класса *«HPLC grade»*. В качестве объекта исследования были использованы экстракты творога и сливочного масла, которые поступили на исследование в государственную надзорную лабораторию города Москвы.

Количественные вычисления стеринов были выполнены с помощью газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. Метод же хромато-масс-спектрометрического детектирования был апробирован с целью получения подтверждающих результатов, ранее детектированных компонентов группы растительные стерины. Таким образом, в данной статье рассматривается только принцип работы масс-спектрометрического метода. В частности, параметры инструментального метода хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования представлены в таблице 1.

Пробоподготовка

Методика подготовки проб полностью соответствует указанной в ГОСТе 33490-2015 (пункт 8.5.2). В частности в коническую колбу вместимостью 150 $см^3$ вносят анализируемую пробу продукта (10,0 ± 0,1 г творог; 1,0 ± 0,1 г масло сливочное), добавляют 0,5 г гидроксила натрия, 30 $см^3$ этилового спирта и проводят гидролиз: кипятят на водяной бане с обратным холодильником на электроплите 60 мин. Содержимое колбы охлаждают до температуры 40°С и добавляют 30 $см^3$ дистиллированной воды. Содержимое колбы помещают в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$, добавляют 15 $см^3$ н-гексана и экстрагируют неомыляемые вещества, осторожно встряхивая в течение 1 мин. Для лучшего разделения слоев добавляют 2 – 4 $см^3$ этилового спирта.

После расслоения фаз верхний н-гексановый слой сливают в коническую колбу, а с нижним слоем дважды повторяют экстракцию с новыми порциями н-гексана по 15$см^3$ каждая. Экстракцию неомыляемых веществ проводят по возможности быстро, предохраняя пробу от попадания на неё прямого солнечного света. Объединённый н-гексановый слой промывают в делительной воронке несколькими порциями по 20$см^3$ дистиллированной до нейтральной реакции промывных вод по универсальной индикаторной бумаге. Отмытую н-гексановую фракцию пропускают через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия, переносят в колбу для упаривания, концентрируют раствор на роторном испарителе при температуре (40 ± 5)°С до объёма 1,5 – 2,0 $см^3$ и переносят в виалу. Концентрированный раствор анализируют с помощью ГХ-МС.

Табл. 1. Параметры инструментального метода.

Инструментарий	
ГХ-МС система	Maestro-αMS
Испаритель	Split/Splitless (liner: Agilent 5062-3587)
Хроматографическая колонка	Rtx-5MS (30m x 0.25mm; 250um)
Экспериментальные настройки	
Объём пробы	1 мкл
Соотношение деления пробы	Splitless; Purge 50 мл/мин после 1.0 мин
t° испарителя	290°C
Режим тока газа-носителя	Режим Constant flow
Градиент t° печи	150°C в течение 1.0 мин; 20.0°C/мин до 290°C, удержание 13.0 мин;
Тип и скорость газа-носителя	(He) 1.0 мл/мин
t° интерфейса МС	270°C

Условия детектирования			
Источник ионизации	*ЭИ (EI)*		
t° источника	250°C		
Задержка растворителя	7.0 мин		
Режимы сканирования	Scan 50 – 550 Да (2000 Да/сек)		
	SIM	Стигмастерин	412.0 *(Quant)* / 351.0 / 300.0
		ϒ-Ситостерин	414.1 *(Quant)* / 329.0 / 302.9
		Фукостерин	314.0 *(Quant)* / 299.0
Параметр «Dwell Time»	Режим iDwell® Time		

Дополнительно в ходе выполнения эксперимента проводили оценку надёжности работы ионного источника, стабильности получаемого сигнала ионных токов на масс-спектрометрическом детекторе в ходе многократного ввода экстракта кисломолочной продукции (в частности творога и масла сливочного). В качестве референсного компонента использовали сигнал стандарта *дифениламина* (концентрация ≈ 0,5 ppm), растворённого в дихлорметане.

Сигнал дифениламина определяли в режиме сканирования ионов 50-500 Да (скорость сканирования 2000 Да/сек), согласно следующим параметрам инструментального метода: хроматографическая колонка Rtx-5MS с неподвижной фазой – диметилполисилоксан с 5% содержанием фенольных групп (параметры колонки: 30 м х 250 мкм; 250 мкм). Газ-носитель – гелий (1,1 мл/мин), термостат хроматографа в режиме программирования температур с 60°C (1 мин) до 280°C (1 мин), со скоростью 15°C/мин. Ввод пробы проводили без деления потока (режим Splitless), температура испарителя – 250°C, температура интерфейса масс-детектора – 250°C, температура ионного источника – 230°C. К результату принимали значение интеграла пика ионного тока с массой 169.0 ± 0.3 Да (ожидаемое время элюирования 9,87 мин).

Обсуждение результатов

Профиль хроматограммы экстракта образца творога представлен на рисунке 1. Очевидно, что хроматографическая система с масс-детектором является уже не просто компаратором, способным сравнивать детектируемые пики с пиками стандартов по времени их элюирования. Масс-спектрометрическая система является уже расширенным анализатором, склонным к более глубокому анализу полученных данных за счёт дополнительного масс-спектрального измерения. Такое преимущество дополнительного фактора массового значения позволяет использовать масс-детектор как основной инструмент подтверждения или опровержения полученных ранее результатов в ходе множественных скрининговых исследований методами газовой хроматографии.

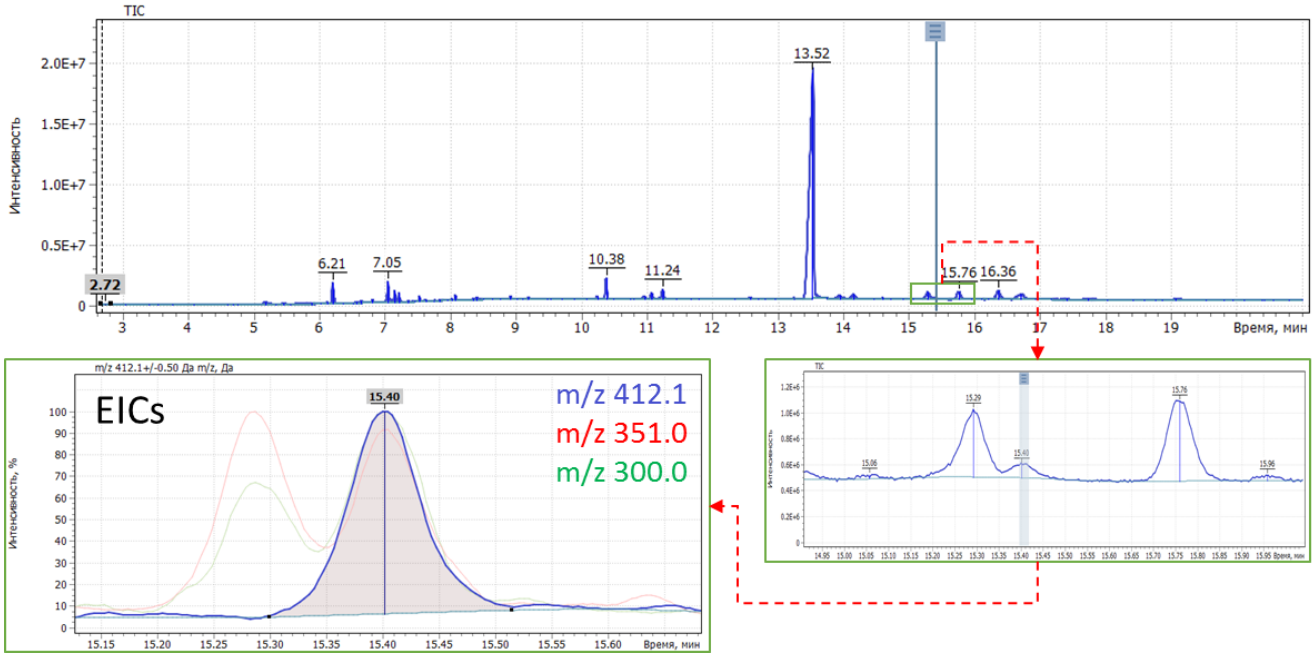
Стоит заметить, что требования и критерии аналитического контроля качества, позволяющие регистрировать сигнал и предполагать наличие соединения в профиле, а также обобщающий методический подход к селективности масс-спектрометрического метода являются результатом многолетней работы множества регулирующих организаций, в частности SANCO [7], EU [8], FDA [6], WADA [5] и др. [2]. Согласно большинству критериев, для качественного подтверждения сигнала принято регистрировать его спектр в режиме сканирования заданного массового диапазона, а также использовать, по крайней мере, 3 иона в режиме селекции выделенных ионов (SIM). При этом, отслеживаемые ионы должны быть:

- ✓ Структурно-специфическими (диагностическими) для анализируемого вещества;

- ✓ Подвержены наименьшим влияниям интерференций;
- ✓ Обеспечивать достаточное соотношение показателя сигнал-шум [3];
- ✓ Соответствовать по времени хроматографического удерживания подобному стандарту;
- ✓ Выполнять требования сохранения соотношения их интенсивностей [4].

Выполнение подобных требований позволяет получать информацию, достаточную для подтверждения детектирования компонентов, ранее определённых другими способами, и сделать надёжное заключение о положительном или отрицательном результате присутствия искомых компонентов в профиле образца [9].

Рис. 1. *Профиль хроматограммы и сигнал компонента стигмастерин, характеризующийся тремя ионными токами.*

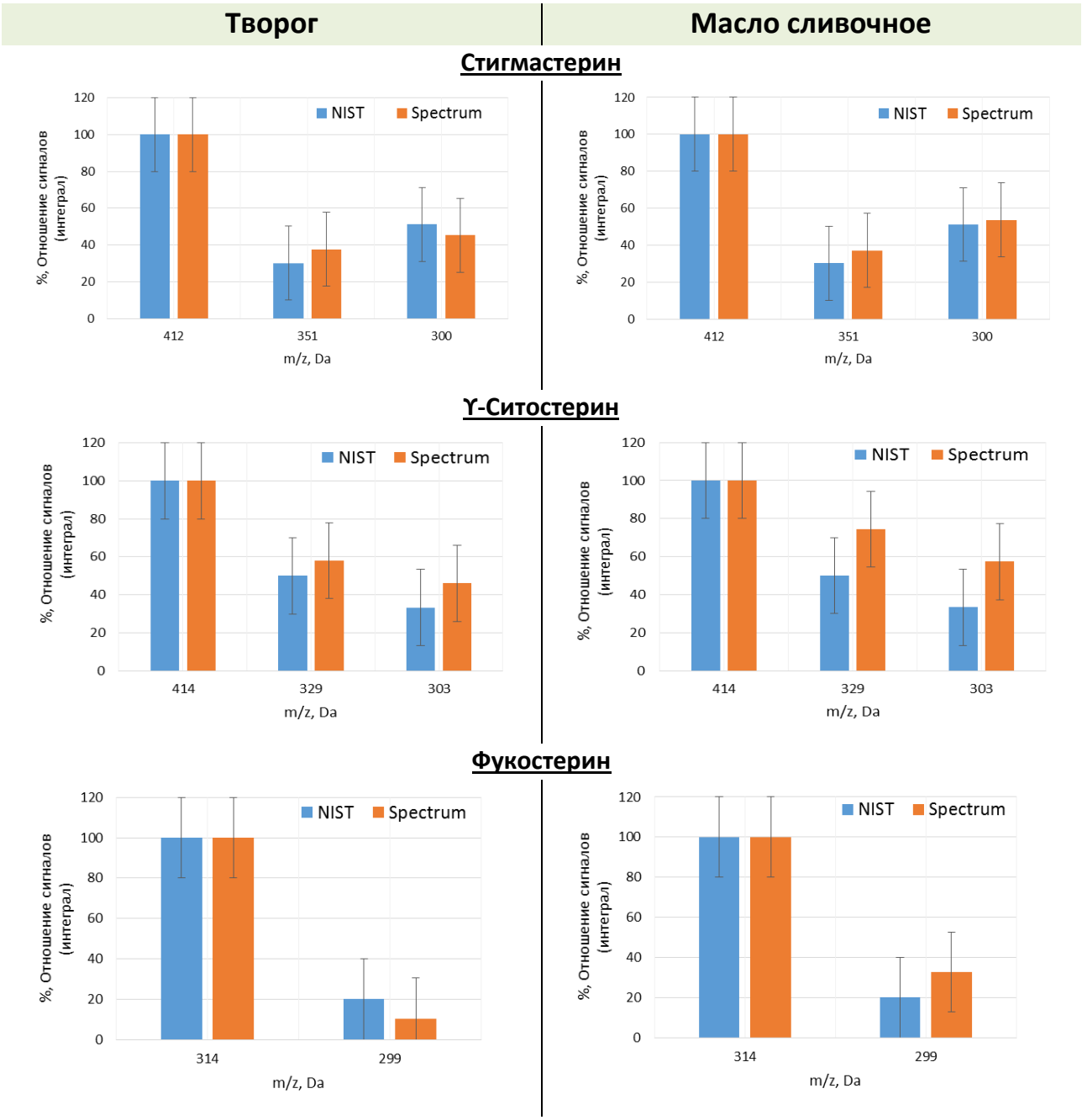


На рисунке 1 наглядно продемонстрированы сигналы ионных токов структурно-специфических ионов компонента стигмастерин, которые лежат на одной линии хроматографического времени элюирования. Заметно, что такие сигналы имеют чёткую гаусообразную форму распределения и не подвержены влиянию интерферирующих сигналов.

Оценку сохранения соотношений ионных сигналов выполняли относительно библиотечного спектра стигмастерина, взятого из коммерческой библиотеки масс-спектров NIST (США). В частности, соотносили значения распределений интегралов выделенных ионных токов и распределений интенсивностей этих же сигналов в библиотечном масс-спектре. Результаты расчётов представлены на диаграммах рисунка 2.

Как видно из диаграммы, все отношения сигналов укладываются в ожидаемый интервал ошибки распределения, что также подтверждает соответствие детектированного компонента. На рисунке 2 также приведены диаграммы отношения сигналов для компонентов β-ситостерин и фукостерин, которые также являются стеринами растительного происхождения.

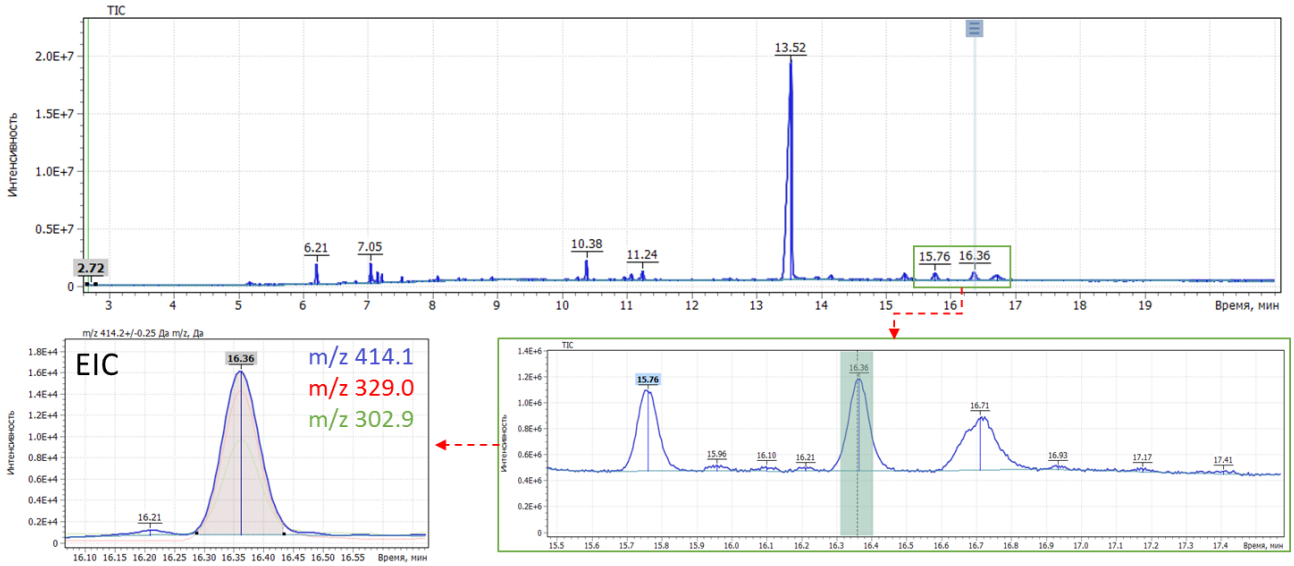
Рис. 2. *Оценка сохранения соотношений ионных сигналов с библиотечным спектром.*



Гамма-ситостерин, как и фукостерин также были детектированы в пробах творога и сливочного масла, что представлено на рисунках 3 и 5. Гамма-ситостерин является стереоизомером бета-ситостерина и структурно подобен холестерину.

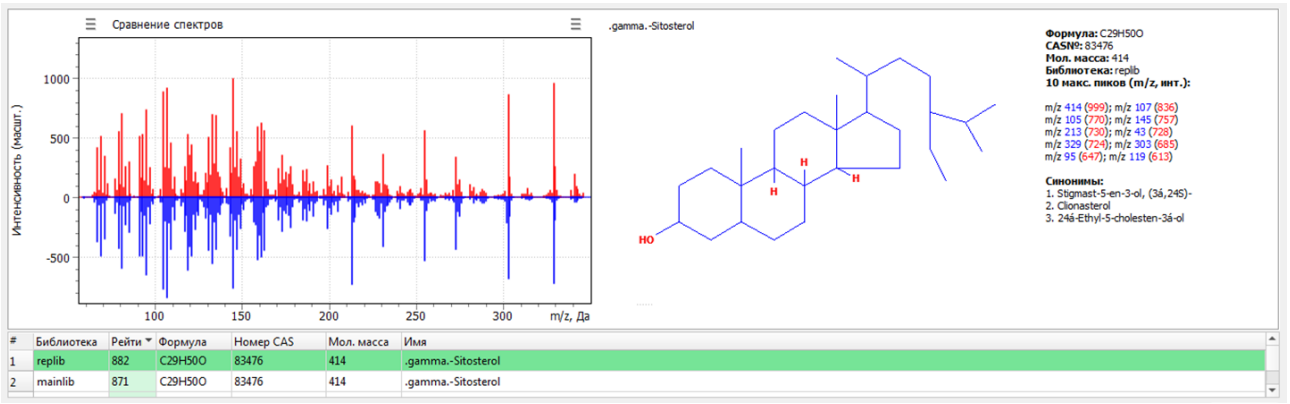
На рисунке 4 продемонстрирована возможность программного сличения масс-спектра гамма-ситостерина с подобным библиотечным масс-спектром. Такой функционал качественного анализа реализован в программном обеспечение Маэстро-Аналитик, который входит в пакет программного обеспечения поставляемого с масс-детектором Маэстро-αMC. При этом возможности функционала качественного анализа предполагают также моментальное отображение информации о структурной формуле и брутто-формуле изучаемого соединения, а также отображение коэффициентов его совпадения с множеством используемых коммерческих или индивидуальных масс-спектральных библиотек.

Рис. 3. *Профиль хроматограммы и сигнал соединения гамма-ситостерин, характеризующийся тремя ионными токами в образце сливочного масла.*



Из данных, представленных на рисунке 3, можно сделать вывод, что сигналы структурно-специфических ионов лежат на одной линии хроматографического времени элюирования, имеют чёткую гаусообразную форму распределения и не подвержены влиянию интерференций.

Рис. 4. *Качественный анализ полученного спектра гамма-ситостерина в экстракте сливочного масла с помощью программного обеспечения Маэстро-Аналитик (верхний спектр (красный) – библиотечный спектр, нижний спектр (синий) – идентифицируемый спектр), коэффициент совпадения 89,3%.*

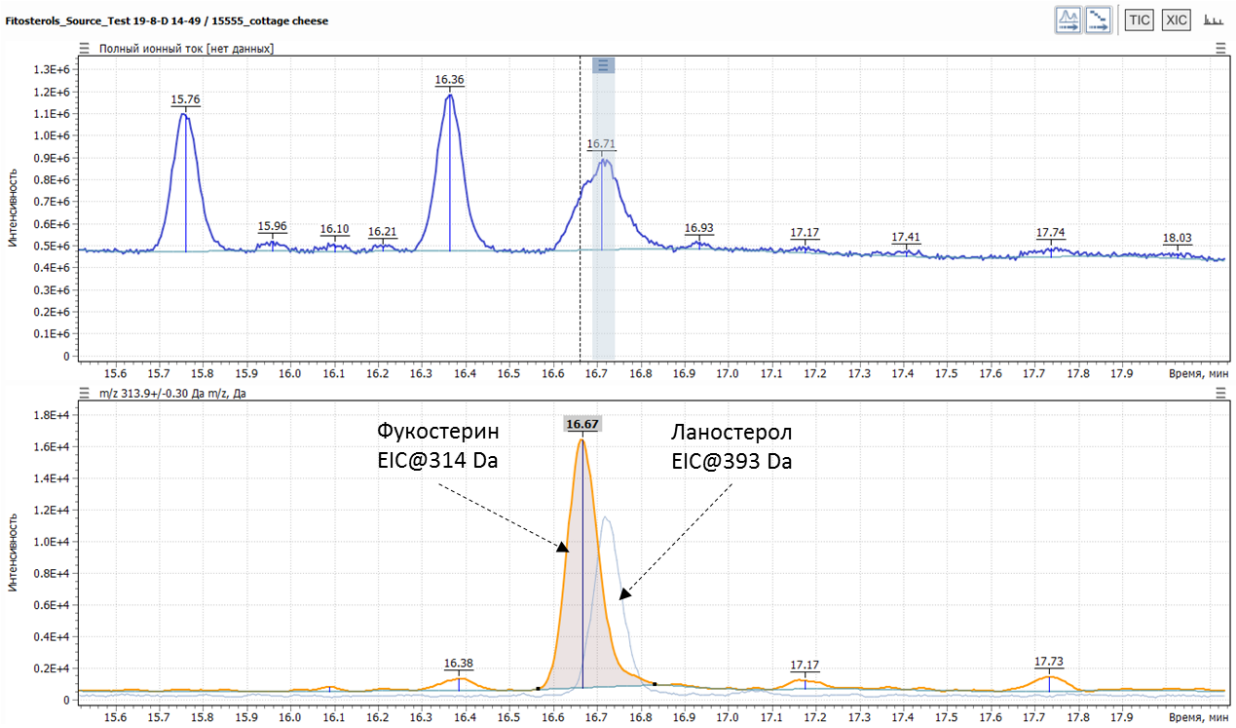


Насыщенная матрица анализируемых экстрактов является ещё одним дополнительным препятствием для корректного и безошибочного определения искомых компонентов с помощью классического пламенно-ионизационного детектора. В частности, изучаемые экстракты имели в своём профиле, по мимо стеринов, также сигналы и дополнительных биогенных компонентов, таких как жирные кислоты и различные гидрофобные соединения, как например, сквален и ланостерол. Последний образуется из оксида сквалена с помощью фермента циклазы и с большой долей вероятности будет присутствовать во всех типах образцов экстрактов молочной продукции, имеющих подобный способ пробоподготовки.

При использовании стандартной хроматографической колонки типа *5MS* (30м х 0,25; 250 мкм) ланостерол имеет время элюирования, практически идентичное с временем

элюирования стерина фукостерин, что представлено на рисунке 5. Разрешить такой сигнал на два составляющих его компонента под силу только масс-спектрометрическому детектору.

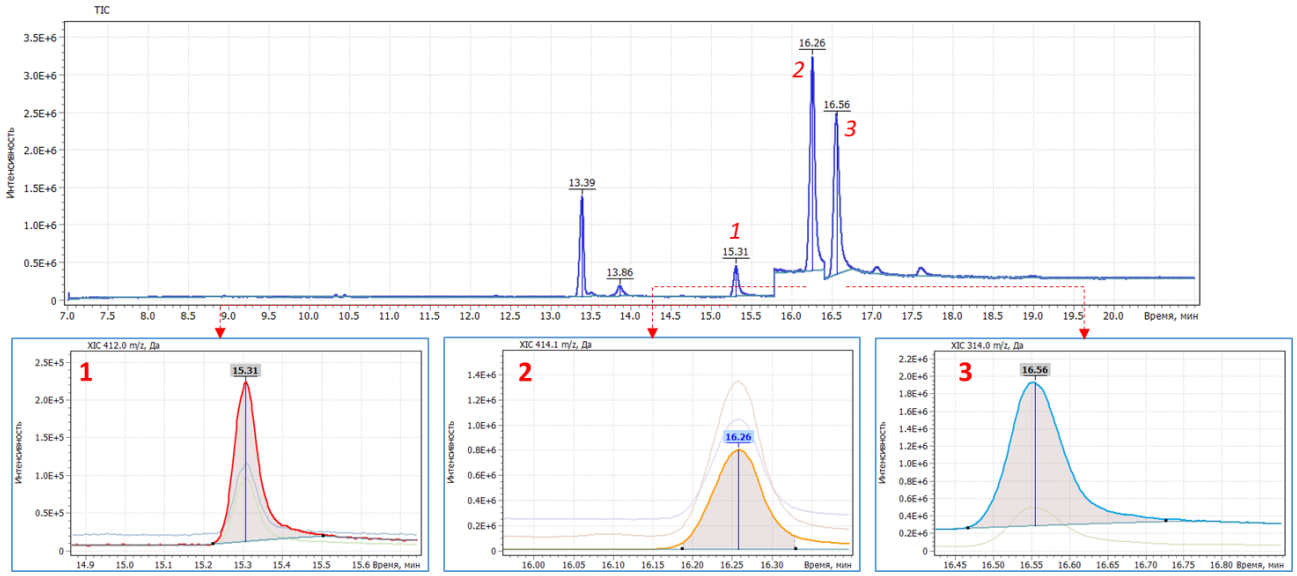
Рис. 5. *Разделение ланостерола и фукостерина в образце творога за счёт построения масс-хроматограмм индивидуально-специфичных ионных токов для каждого компонента.*



Ещё одним дополнительным критерием подтверждения присутствия растительных стеринов в образцах является анализ с помощью режима сканирования выделенных ионов (SIM), где для каждого целевого компонента экстракта были выбраны структурно-специфичные ионы. Результаты детектирования трёх растительных стеринов в экстракте творога представлены на рисунке 6.

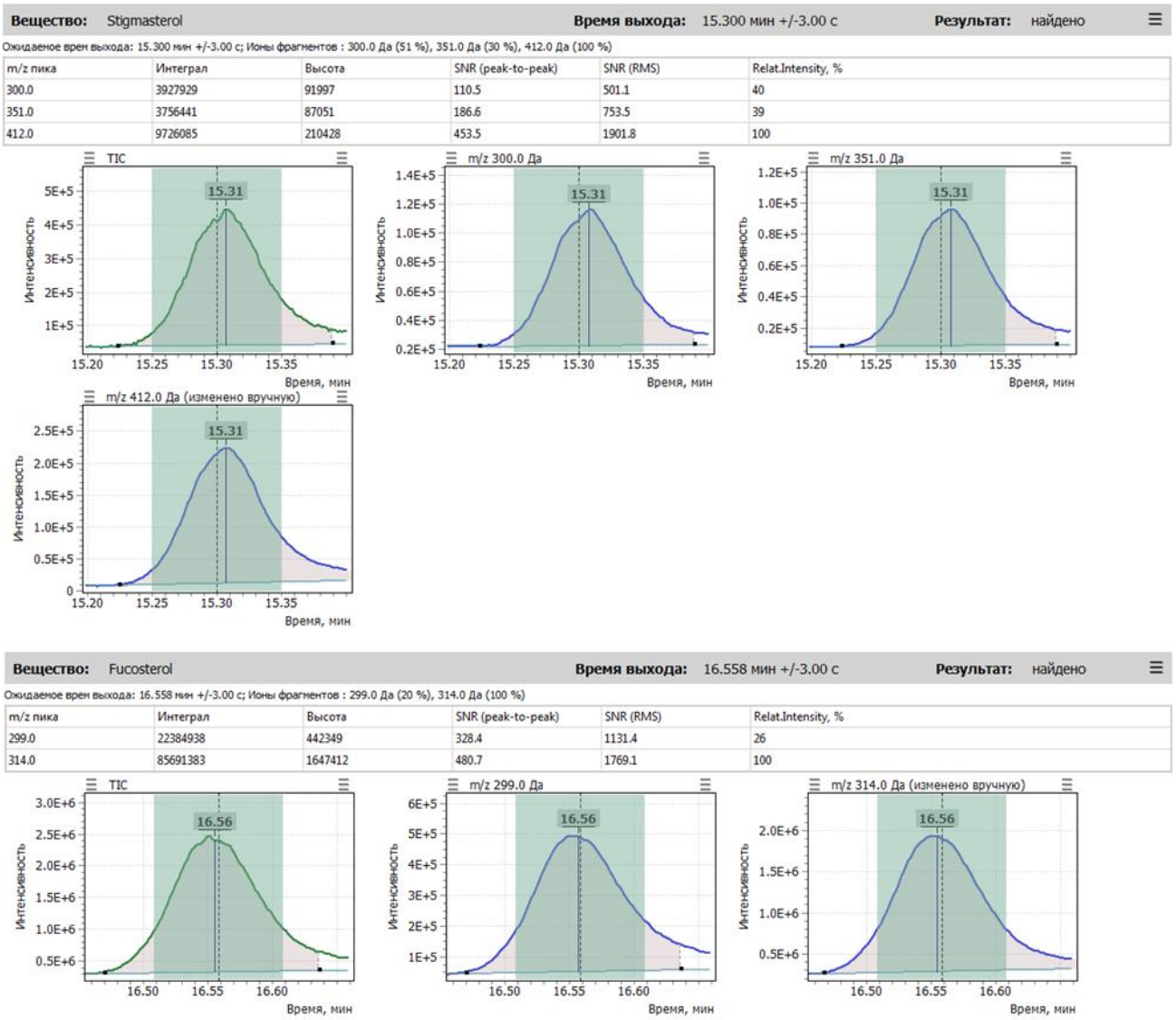
Рис. 6. *Масс-хроматограмма выделенных ионов экстракта творога, полученная в режиме сканирования SIM.*

1. Стигмастерин; 2. ϒ-Ситостерин; 3. Фукостерин



Стоит отметить ещё и удобный функционал формирования отчёта в программном обеспечении Маэстро-Аналитик. На рисунке 7 представлен фрагмент страницы отчёта качественного анализа, где наглядно отображены все целевые структурно-специфические ионы, которые характеризовали каждый компонент экстракта. Дополнительно в виде табличных данных представлены характеристики каждого сигнала. Таким образом, каждый сигнал характеризуется своими показателями площади пика, высоты, его относительной интенсивности и показателями отношений сигнала к шуму («RMS» и «Peak-to-Peak»). Такой полной информации уже достаточно для выполнения всех требований, согласно принятым регламентам, для подтверждения или опровержения ранее детектированных целевых компонентов классическими и рутинными методами газохроматографического анализа.

Рис. 7. *Фрагмент страницы отчёта качественного анализа в программном обеспечении Маэстро-Аналитик (компонент стигмастерин характеризовали по трём ионам + сигнал пика полного ионного тока (TIC), а компонент фукостерин характеризовали по двум структурно-специфичным ионам + сигнал пика полного ионного тока).*



Оценка стабильности системы

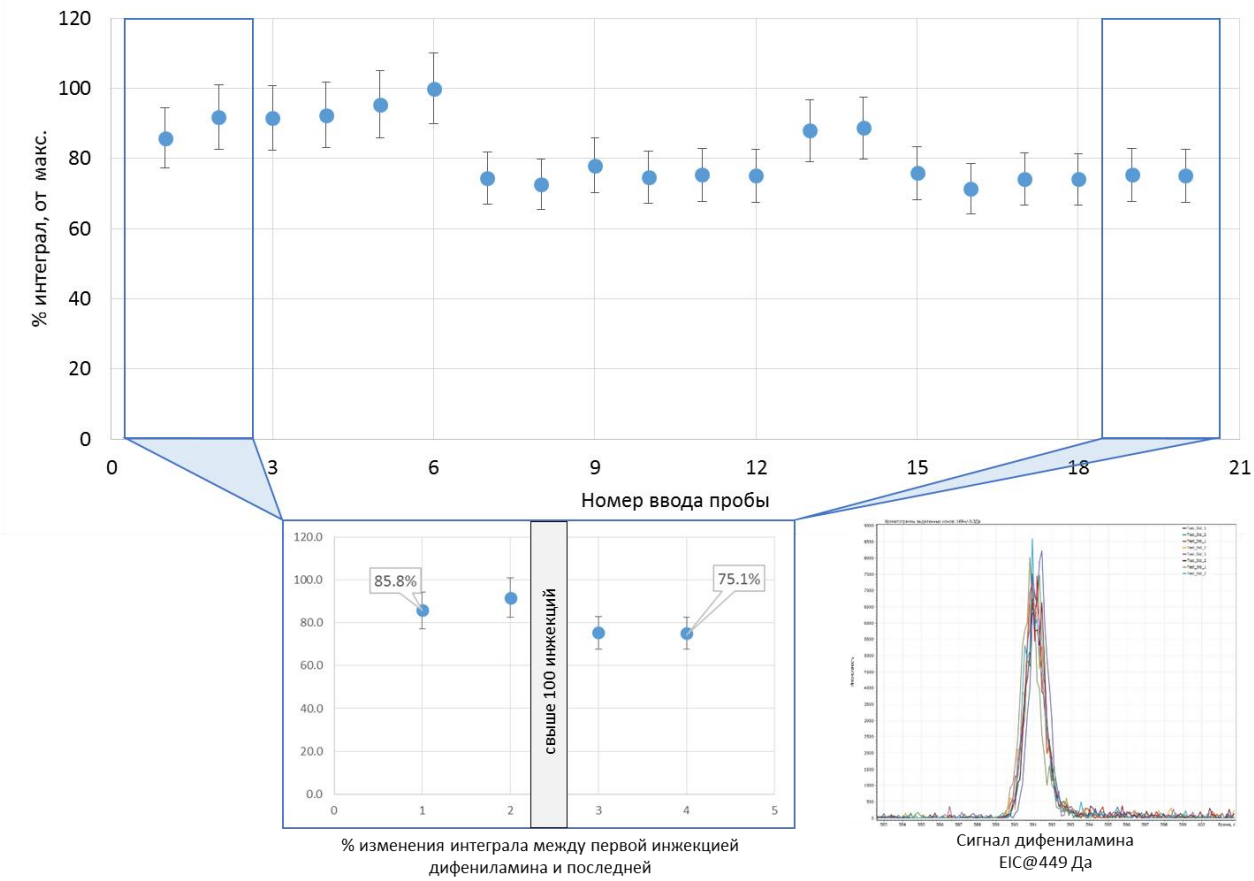
Одним из наиболее важных пунктов при работе масс-детектора с насыщенной матрицей является стабильность и постоянство характеристик получаемых сигналов, в

частности, его интенсивности. Ионный источник электронного удара, является одним из наиболее зависимых к загрязнению элементов системы, так как конструкция подобных источников обычно *«закрытого типа»*. Это позволяет дополнительно концентрировать компоненты пробы в ионном источнике и тем самым достигать их детектирования на уровне следовых количеств.

Для работ со сложными экстрактами проб растительного и биологического происхождения масс-детектор Маэстро-αMC оснащён специально разработанным инертным изотермическим керамическим ионным источником. Такой тип источника устойчив к пробам с высоким содержанием матричных компонентов и не требует частого обслуживания. Продемонстрировать заявленную стабильность источника предложено множественным вводом экстрактов творога и сливочного масла в масс-детектор с последующей инжекцией стандартного соединения дифениламин в режиме сканирования выбранного диапазона масс (SCAN) и сравнением интеграла площади ионного пика дифениламина (масса 169,0 Да) в начале эксперимента и спустя более сотни инжекций кисломолочных экстрактов.

Результаты исследования отображены на рисунке 8. Рисунок демонстрирует стабильность интеграла пика ионного тока на протяжении всего эксперимента. Наблюдаемые колебания на диаграмме, укладываются диапазон ошибки (± 10%), при этом изменение сигнала спустя 112 инжекций насыщенной матрицы составило только 10% (с 85% от максимальной точки до 75%).

Рис 8. *Результаты изменения интеграла площади ионного пика дифениламина через каждые 8 инжекций экстрактов кисломолочной продукции (творог и сливочное масло).*

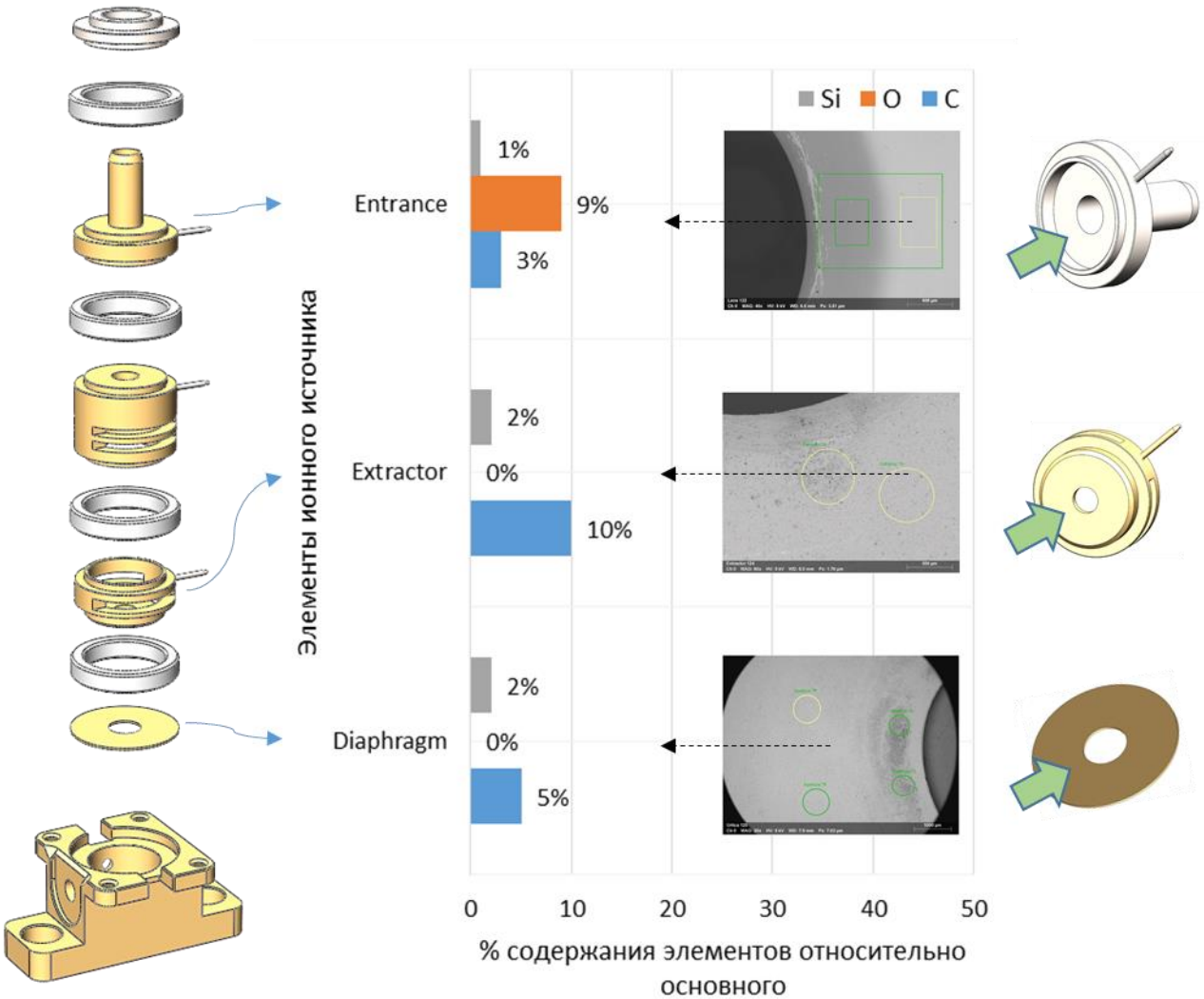


Дополнительно для подтверждения надёжности и инертности керамического ионного источника было выполнено исследование с помощью электронного микроскопа Hitachi

ТМ4000 Plus, в котором провели специальную съёмку поверхностей оптических элементов ионного источника после множества вводов экстрактов кисломолочной продукции. Съёмку выполняли с использованием приставки для элементного анализа при различном ускоряющем напряжении от 5 до 15 кВ и с кратностью увеличения от 20 до 40.

Результаты съёмки представлены на рисунке 9. После сотни инжекций экстракта на поверхности основных оптических элементов были зафиксированы только три элемента: низкие значения содержания углерода и кислорода, а также единичные проценты содержания кремния. Такое сквозное сканирование всех рабочих поверхностей проводящих электродов ионного источника подтверждает отсутствие какой-либо значительной органической плёнки на их поверхностях, которая могла бы повлиять на характеристики генерируемых масс-детектором сигналов. Полученные результаты эксперимента подтверждают уникальность и инертные свойства керамического источника хромато-масс-детектора Маэстро-αМС.

Рис. 9. *Результаты элементного анализа проводящих поверхностей электродов ионного источника после множественных инжекций насыщенной матрицы кисломолочной продукции. На рисунке показаны элементы, принятые к анализу, представлены их фотографии, а также стрелками указаны места выполнения элементного анализа.*



Выводы

1. Результаты эксперимента показали, что хромато-масс-спектрометрическая система Маэстро-αMC отвечает самым современным требованиям приборного парка для выполнения качественного анализа присутствия фитостеринов в кисломолочной продукции.
2. Функционал программного обеспечения Маэстро-Аналитик, позволяет проводить полноценную оценку получаемых данных и выводить результаты скрининга на отчёт в удобном формате просмотра данных.
3. Результатами исследования также подтверждена инертность керамического источника. Продемонстрированы как аналитические, так и микроскопические исследования, которые показали высокую надёжность и уникальность ионного источника.

Литература

1. *Стайнова Е.,* «Методы обнаружения растительных жиров в молочной продукции, в том числе по наличию фитостеринов», журнал «СЭС», №11, 2017.
2. *Колунтаев Д.А.,* Алгоритма пост-процессинга «Flexible SIM» для снижения порога чувствительности методов следовых количеств органических веществ в сложных биологических матрицах, Application Note, d.o.o. "Q-Tek".
3. GTFCh Scientific Committee Quality Control “Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses”, 1 Jun 2009.
4. CAG/GL 56-2005 “Guidelines on the use of mass-spectrometry (MS) for identification, confirmation and quantitative determination of residues”, 2005.
5. WADA Technical Document – TD2010IDCR.
6. http://www.fda.gov/
7. EC SANCO/12571/2013 “Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed”, Implemented by 01/01/2016.
8. http://ec.europa.eu/health/index_en.htm
9. *Pozo O.J., Sancho J.V., Ibáñez M., Hernández F., Niessen W.M.A.* (2006) «Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achievements and pitfalls». TRAC-Trends in Analytical Chemistry. 25: 1030-1042.
10. *https://drugs.ncats.io/drug/5LI01C78DD*