APP NOTE-8/2019GCMS



Определение содержания сложных эфиров жирных кислот хлорпропандиолов (MCPD) и 3-бромпропандиола (MBrPD) с применением газового хромато-масс-спектрометра **«Маэстро-αMS»**.

Шахов А. В. *заместитель начальника научно-производственной лаборатории* ***ООО "ЭФКО Пищевые Ингредиенты"***

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

Чувелёв Е.В. *научный сотрудник отдела исследований и разработок,* ***ООО Интерлаб****, Россия, Москва*

Ключевые слова

Газовая хромато-масс-спектрометрия, глицидиловые эфиры жирных кислот, растительное масло, iDwell®Time, SIM Wizard®, SIM

Резюме

Продемонстрированы возможности хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC на примере определения остаточных количеств глицидиловых эфиров жирных кислот в образцах растительного масла.

Введение

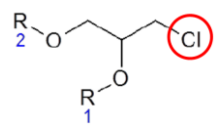
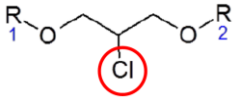
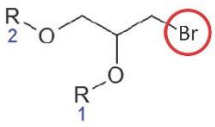
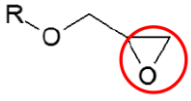
Эфиры 3-монохлорпропандиола (3-MCPD) и глицидиловые эфиры жирных кислот являются пищевыми примесями и в незначительных количествах могут быть обнаружены в составе растительных масел. Но даже такие количества способны проявлять генотоксические действия, которые были научно обоснованы в 83-ем отчете Объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам «Заключение по присутствию определенных примесей в продуктах питания» и в заключении Группы Европейского агентства по безопасности продуктов питания по примесям в пищевой цепи (CONTAM) «Риски для здоровья человека, связанные с наличием 3-и 2-монохлоропропандиола (MCPD), и их сложных эфиров жирных кислот, и глицидиловых эфиров жирных кислот в продуктах питания» (рис. 1).

Принцип их воздействия заключается в том, что глицидиловые эфиры жирных кислот гидролизуются в желудочно-кишечном тракте до глицидола, который, в свою очередь, и является генотоксичным соединением. В мае 2016 года Европейское агентство по продовольственной безопасности (European Food Safety Authority, EFSA) опубликовало доклад, в котором представлена взаимосвязь между употреблением в пищу пальмового масла, рафинированного при температуре выше 200°C, с вероятностным развитием раковых заболеваний. Ранее о подобной связи также заявляли эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). С 2018 года в странах Европейского Союза введён лабораторный контроль остаточных количеств глицидиловых эфиров в пищевой продукции, а также утверждены нормативы их содержания. Не так давно в РФ также заговорили о необходимости контроля содержания глицидиловых эфиров жирных кислот. Масложировая отрасль приняла этот вызов и к проблеме подключились крупные производители. Благодаря современному оборудованию решение проблемы стало возможным. Группа компаний "ЭФКО Пищевые Ингредиенты", используя оборудование компании ООО «Интерлаб», смогла измерить и впоследствии снизить в своей продукции содержание глицидиловых эфиров.

Источником образования глицидиловых эфиров жирных кислот может служить нарушение технологических режимов рафинирования растительных масел. В частности, при нагревании масел до температур, превышающих 200°C, на стадиях дезодорации и/или переэтерификации.

Существует несколько методов контроля глицидиловых эфиров жирных кислот: метод медленной кислотной этерификации растительного жира с целью удаления матрицы, переводом глицидиловых эфиров в монобромпропандиол и с последующим получением этерифицированных форм с фенилборной кислотой, а также метод медленной щелочной этерификации. Настоящая работа описывает принцип метода *медленной кислотной этерификации,* (методы AOCS Cd 29a, (b, c) - 13, ISO 18363-3 и DGF CIII 17(18) (09) B).

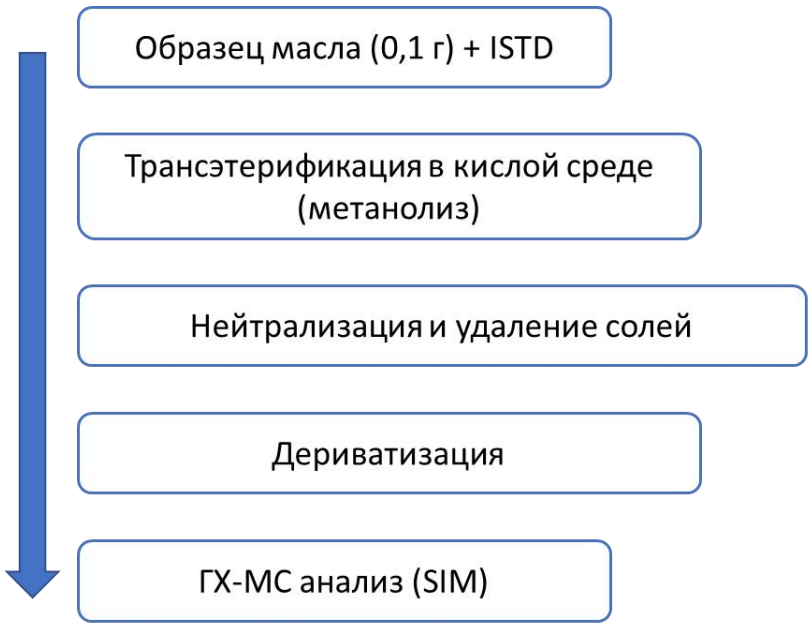
Рис. 1. Структурные формулы анализируемых соединений

3-MCPD	***2-MCPD***	***3-MBPD***	***Глицидол***
			

Экспериментальная часть

В кислом растворе, содержащем бромиды, сложные эфиры глицидола преобразуются в моноэфиры 3-монобромопропандиола (3-MBrPD), после чего в кислотном растворе, содержащем уже метанол, сложные эфиры 3-MBrPD вместе со сложными эфирами 3-MCPD 2-MCPD и переходят в свободную (неэтерифицированную) форму. Далее выполняется стадия удаления метиловых эфиров жирных кислот, после чего глицидиловые эфиры жирных кислот, образовавшиеся в ходе реакции, экстрагируются из пробы и дериватизируются с помощью фенилборной кислоты. По завершению экстракт вводят в газовый хроматограф с масс-спектрометрическим детектором, в режиме сканирования выборочных ионов (SIM), согласно таблице 1 и 2.

Общая схема метода



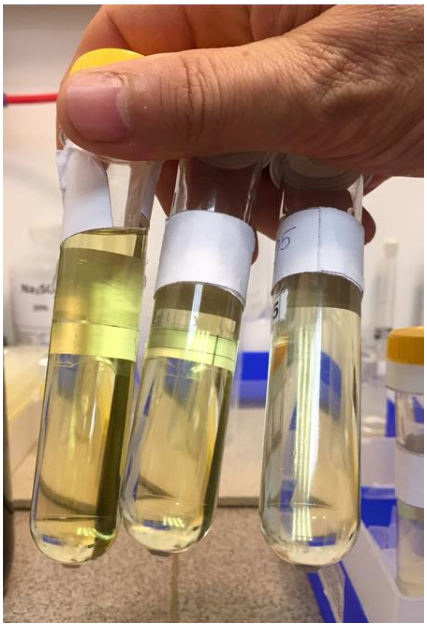


Табл. 1. *Параметры инструментального метода.*

Оборудование	
ГХ-МС система	Interlab «Маэстро-αMS»
Испаритель	Split/Splitless (liner: Restek 4 mm x 6.3 x 78.5)
Хроматографическая колонка	Rtx-5MS (30m x 0.25mm; 250um)
Параметры хроматографического разделения	
Объём пробы	1,0 мкл
Режим испарителя	Splitless; Purge 75 мл/мин после 1,0 мин
T° испарителя	250°C
Режим работы испарителя	Режим Constant Pressure
Градиент t° печи	60°C в течение 1,0 мин; 6,0°C/мин до 140°C, удержание 0,0 мин; 5,0°C/мин до 200°C, удержание 0,0 мин; 35,0°C/мин до 290°C, удержание 6,0 мин;
Давление газа-носителя	(He) 6,33 psi
T° интерфейса МС	250°C

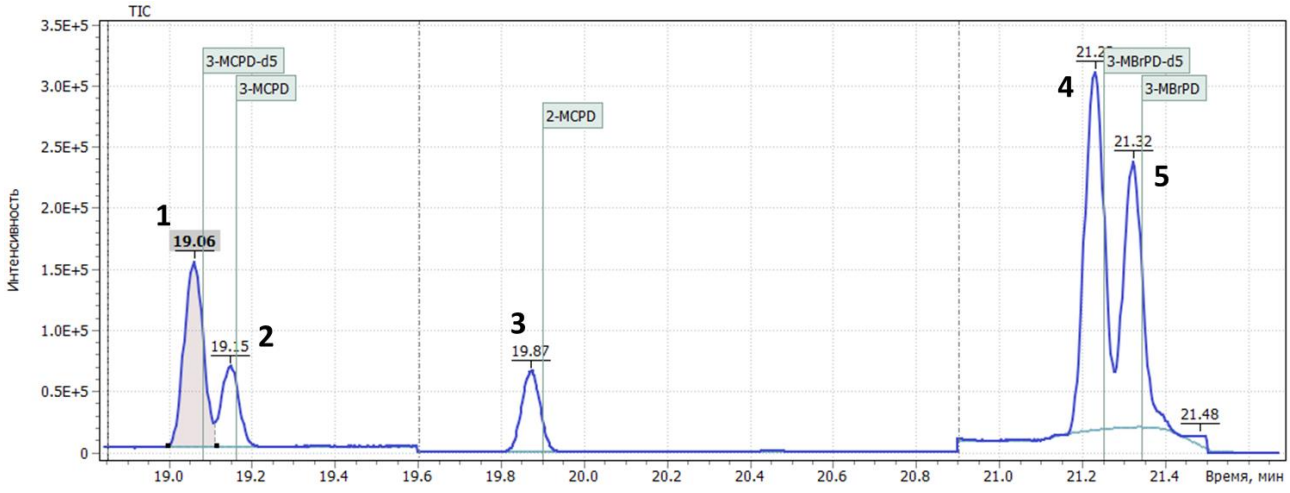
Параметры детектирования	
Источник ионизации	*ЭИ (EI)*
T° источника	230°C
Задержка растворителя	17,5 мин
Режимы сканирования	SIM (параметры указаны ниже)
Параметр Dwell Time	Принцип расчёта согласно методу iDwell® Time

Перечень целевых соединений и параметры их детектирования представлены в таблице 2.

Табл. 2. Времена элюирования искомых пиков целевых ионов и параметры их сканирования.

№	Действующее вещество	*Главный ион (Quant)*	Подтверждающий ион (Qual-1)	Подтверждающий ион (Qual-2)	Время элюирования
1	3-MCPD-d5	150	201	203	19.1 мин
2	3-MCPD	147	196	198	19.2 мин
3	2-MCPD	196	198	-	19.9 мин
4	3-MBrPD-d5	150	245	-	21.3 мин
5	3-MBrPD	147	240	-	21.3 мин

Рис. 2. Модельная хроматограмма смеси глицидиловых эфиров в матрице масла *(концентрация 0.5 ppm)*.



1. 3-MCPD-d5; **2.** 3-MCPD; **3.** 2-MCPD; **4.** 3-MBrPD-d5; **5.** 3-MBrPD

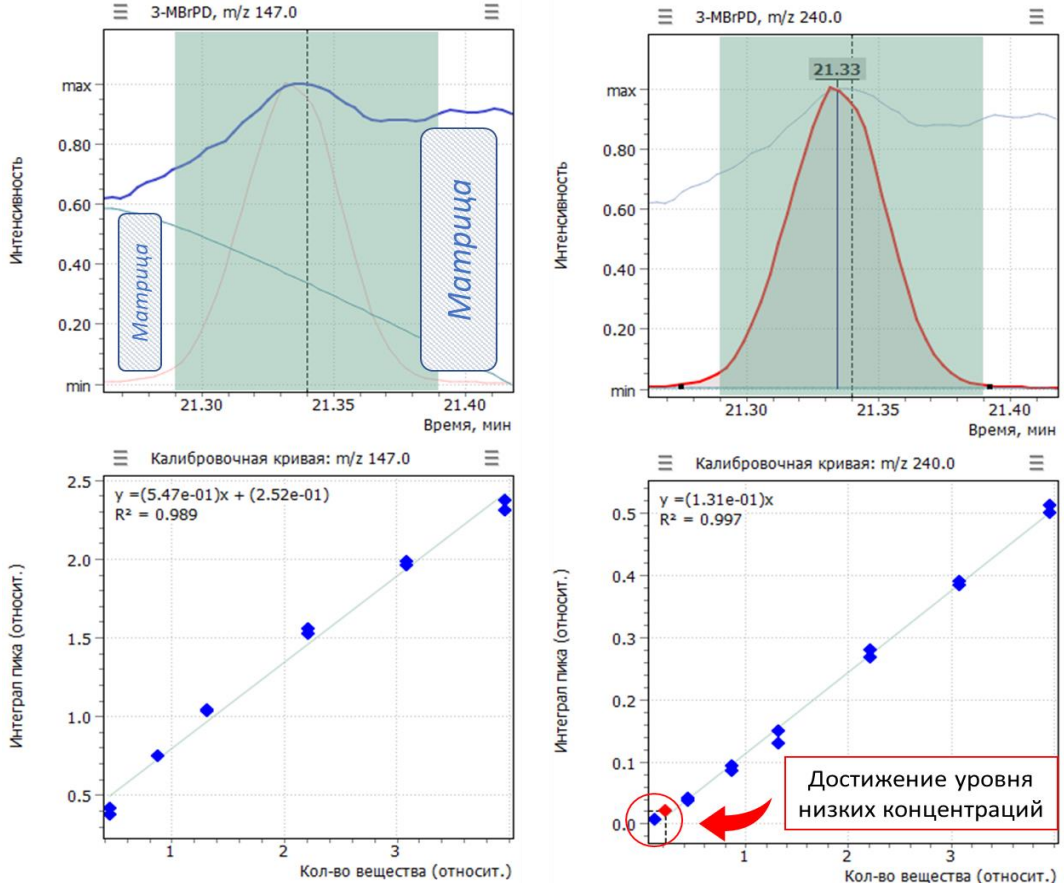
<u>Алгоритм пост-обработки данных Flexible SIM.</u>

Матрица растительного сырья, в частности масла, является сложным биологическим объектом с присутствием большого количества высокомолекулярных органических соединений. Их частота и интенсивность в спектре формируют, так называемую «спектральную матрицу», которая зачастую не позволяет надёжно детектировать сигналы целевых ионов. Подобный эффект выражается искажением уровня сигнала ионов и не возможностью достижения низких пределов обнаружения метода. Избежать подобной проблемы помогает алгоритм пост-процессинга «Flexible SIM», который входит в пакет программного обеспечения «Маэстро-Аналитик» (ООО «Интерлаб»). Подробности работы и алгоритм детально описаны в следующей публикации. [12] Вкратце, алгоритм позволяет

эксперту изменять расчётный (главный) ион для выполнения количественного анализа уже после сбора данных («пост-процесс»).

На рисунке 3 представлена матричная калибровка соединения 3-MBrPD, где можно заметить искажение одного из сигналов на уровне низких концентраций (m/z 147 Да) за счёт матричных помех. Применение алгоритма «Flexible SIM» позволило быстро переключиться на использование подтверждающего иона в роли главного иона и корректно построить калибровочную зависимость для искомого соединения (3-MBrPD) во всём диапазоне требуемых концентраций.

Рис. 3. Матричная калибровка соединения 3-MBrPD с искажением сигнала (147 Да) на уровне концентраций 0,069 ppm за счёт «матричных» помех.



Результаты и обсуждение

Количественное определение глицидиловых эфиров жирных кислот проводили с использованием калибровки по внутреннему стандарту. В качестве внутренних стандартов использовались дейтерированные стандарты определяемых компонентов. Для построения калибровочной зависимости использовали 9 калибровочных уровней, включая уровень нулевой концентрации - «Бланк» (табл. 3). Коэффициенты корреляции для всех искомых соединений глицидиловых эфиров жирных кислот составили R^2 ≥0,99 (рис. 4).

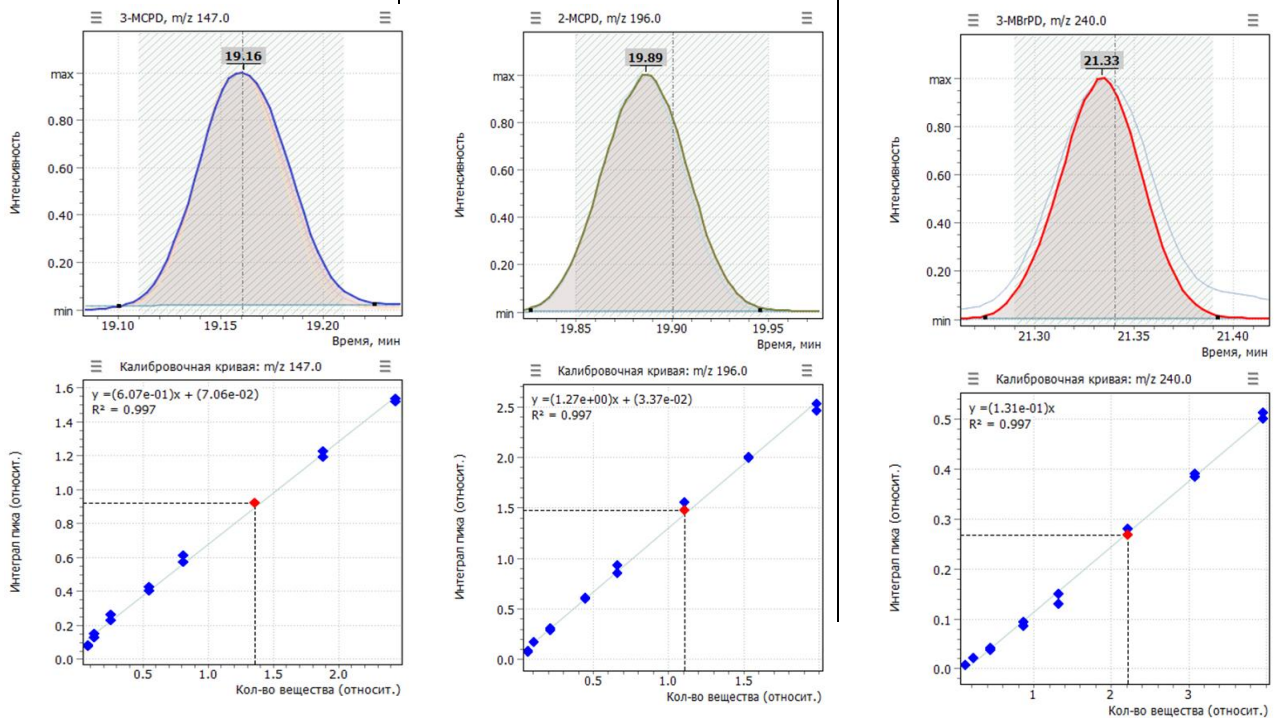
Табл. 3. Схема построения калибровочных кривых для соединений 3-MCPD, 2-MCPD и 3-MBrPD, а также их дейтерированных внутренних стандартов.

(*все значения даны с учётом поправки на чистоту используемых стандартных веществ).*

Калибровочные уровни	3-MCPD, (ppm)	2-MCPD, (ppm)	3-MBrPD, (ppm)	3-MCPD-d5, (ppm)	3-MBrPD-d5, (ppm)
Бланк	0.000	0.000	0.000	0.39	0.62
Уровень 1	0.031	0.025	0.069	0.39	0.62
Уровень 2	0.051	0.042	0.139	0.39	0.62
Уровень 3	0.102	0.083	0.276	0.39	0.62
Уровень 4	0.214	0.175	0.542	0.39	0.62
Уровень 5	0.316	0.258	0.818	0.39	0.62
Уровень 6	0.53	0.432	1.370	0.39	0.62
Уровень 7	0.734	0.598	1.912	0.39	0.62
Уровень 8	0.949	0.773	2.454	0.39	0.62

Рис. 4. Линейные зависимости и сигналы главных ионных токов искомых соединений.

3-MCPD	2-MCPD	3-MBRPD



Данный метод апробирован на различных образцах масел, жиров и масложировых субстанций. На рисунках 5 и 6 отображены хроматограммы масла подсолнечника и кукурузного масла, результаты исследования представлены в таблицах 4 и 5.

По всем образцам и компонентам получены результаты с высокой степенью извлечения (87% - 108%). Отмечается надежность и повторяемость получаемых результатов. При этом важную роль играет применение внутренних стандартов и использование матричной калибровки для построения калибровочной зависимости. Все эти действия минимизируют возможный «матричный эффект», что и выражается в высокой точности

получаемых результатов. Следует отметить, что метод применим как для твердых, так и для жидких жиров и масел.

Линейность метода во всем диапазоне концентраций составила от 0,03 до 0,93 ppm. Предел количественного определения метода (LOQ) составил не менее 0,05 ppm, инструментальный предел детектирования прибора (LOD) составил не менее 0,01 ppm.

Рис. 5. Хроматограмма TIC образца подсолнечного масла.

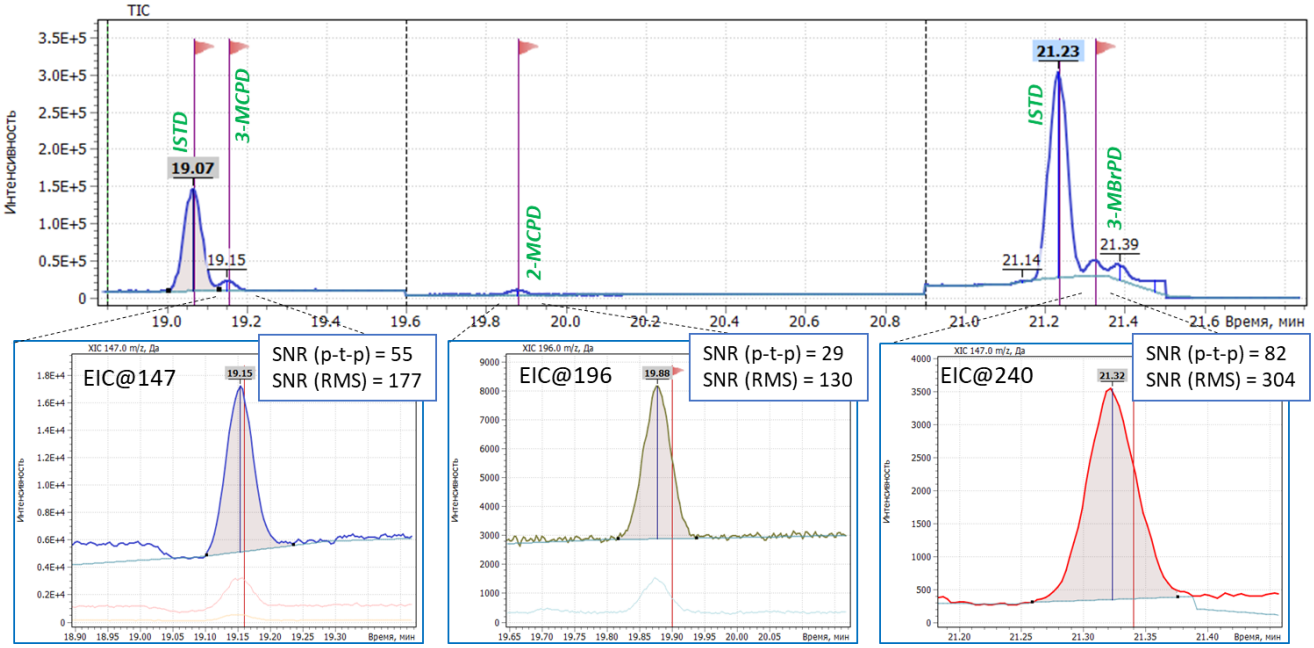


Табл. 4. Результаты анализа подсолнечного масла.

Искомые компоненты	Время элюирования, мин	Полученные результаты, ppm	Макс. допустим. уровень, ppm
3-MCPD	19.15 ± 0.05	0.02	> 1.0
2-MCPD	19.88 ± 0.05	0.01	> 1.0
3-MBrPD	21.33 ± 0.05	0.13	> 1.0

Рис. 6. Хроматограмма TIC образца кукурузного масла.

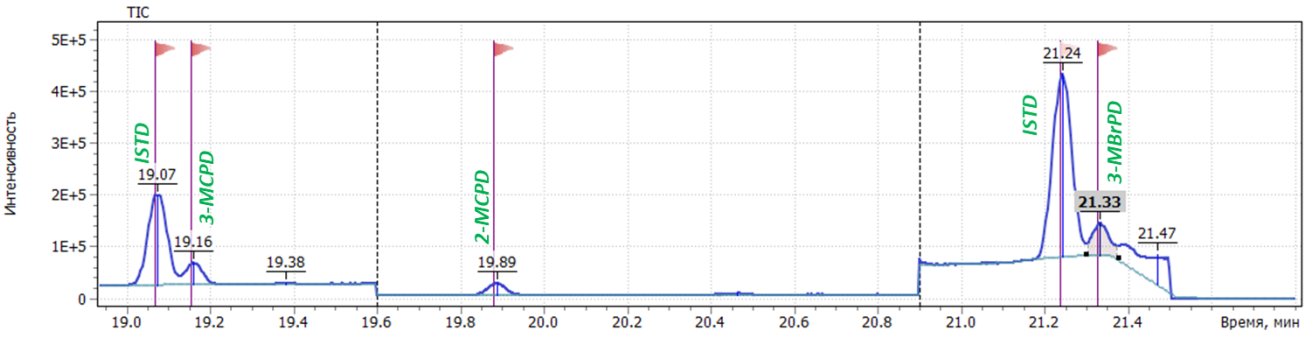


Табл. 5. Результаты анализа кукурузного масла.

Искомые компоненты	Время элюирования, мин	Полученные результаты, ppm	Макс. допустим. уровень, ppm
3-MCPD	19.15 ± 0.05	0.11	> 1.0
2-MCPD	19.88 ± 0.05	0.05	> 1.0
3-MBrPD	21.33 ± 0.05	0.22	> 1.0

Выводы

Относительная простота метода и стабильность результатов предоставляют возможность контроля содержания глицидиловых эфиров жирных кислот во входящем сырье масел и масложировых смесей, а также продуктов на промежуточных и конечных стадиях производства. Метод также позволяет расширить возможности для оптимизации производственного процесса и обеспечения пищевой продукции высокого качества.

Хромато-масс-спектрометрическая система «Маэстро-αMC» позволяет детектировать глицидиловые эфиры жирных кислот на уровнях концентраций, достаточных для надёжного контроля их остаточных количеств в образцах.

Литература

1. Kraft R., Brachwitz H., Etzold G., Langen P., Zöpel H.-J. Massenspektrometrische Strukturuntersuchung Stellungsisomerer Fettsäureester der Halogenpropandiole (Desoxyhalogen-glyceride). J. Prakt. Chem. 1979, 321 pp. 756–768.
2. Ermacora A., & Hrnčiřík K. A Novel Method for Simultaneous Monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and Glycidyl Esters in Oils and Fats J. Am. Oil Chem. Soc. 2013, 90 pp. 1–8.
3. Ermacora A., & Hrnčiřík K. Evaluation of an Improved Indirect Method for the Analysis of 3-MCPD Esters Based on Acid Transesterification J. Am. Oil Chem. Sos. 2012, 89 pp. 211-217.
4. ISO 18363-3:2017 Animal and vegetable fats and oils -- Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS -- Part 3: Method using acid transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol.
5. Karel Hrncirik, Unilever, The Netherland Indirect methods for the Analysis of MCPD and Glycidyl Esters: A Critical Overview. 2011.
6. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaften: DGF Einheitsmethode C-VI 17 (10) Abteilung C 1. WVG Stuttgart (2010).
7. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaften: DGF Einheitsmethode C-VI 18 (10) Abteilung C 1.WVG Stuttgart (2010).
8. Miyazaki K, Koyama K, Sasako H, Hirao T: Indirect Method for Simultaneous Determinations of 3-Chloro-1,2-Propanediol Fatty Acid Esters and Glycidyl Fatty Acid Esters. J Am Oil Chem Soc 89, 1403–1407 (2012).
9. International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 77. Some industrial Chemicals. www.monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol96/index.php (letzter Zugriff: 09.01.2013).
10. AOCS Official Method Cd 29a-13 2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats by Acid Transesterification.
11. Crews C, Chiodini A, Granvogl M, Hamlet C, Hrncirik K, Kuhlmann J, Lampen A, Scholz G, Weisshaar R, Wenzl T, Jasti PR, Seefelder W: Analytical Approaches for MCPD esters and Glycidyl esters in food and biological samples: A review and future perspectives. Food Addit Contam A 30,11–45 (2013).
12. Колунтаев Д.А. Определение остаточных количеств действующих веществ пестицидов в образце винного сорта винограда с использованием инновационного алгоритма расчёта количественного анализа данных **«Flexible SIM»** и квадрупольного масс-детектора **«Maestro-αMS»**. / App Note-7/2019GCMS, ООО «Интерлаб», 2019