



Кат Ч.Р.
Маремунов Х.А.

Ускоренный способ обнаружения стерина в молочной продукции методом хромато-масс-спектрометрии

Аннотация

Исследование компонентов, содержащихся в жировой фазе молока и молочных продуктов, основано на предварительном гидролизе стероидов в стерины и последующим хроматографическом их разделении на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором и сравнении полученных масс-спектров стерина со спектрами и временем удерживания стандартных веществ.

Введение

Стерины (стеролы) – это природные органические соединения, производные стероидов. Стерины подразделяются на три группы: 1) фитостерины (содержатся только в растительных жирах), 2) микостерины (содержатся только в грибах) и 3) зоостерины (содержатся только в животных жирах). Они представляют собой нетвёрдый белый порошок с характерным запахом, который растворяется в спирте и не растворяется в воде. Область применения: косметика, медицина и в качестве пищевых добавок.

Анализ стерина, содержащихся в жировой фазе животного или растительного происхождения является одним из показателей качества продукции. Самый распространённый зоостерин – холестерин, представляющий основную часть всех стерина молочного и других животных жиров. Основную же часть всех фитостерина представляют: брассикастерин, кампестерин, стигмастерин, β -ситостерин. Т.е. в молочном и других животных жирах содержится только холестерин, а фитостерина нет, так же как в растительном жире содержится лишь фитостерина, и холестерина там нет.

При анализе молока и молочной продукции на содержание растительных масел и жиров на растительной основе наиболее широко используют ГОСТ 33490—2015 следующие методы подготовки пробы: метод с предварительным выделением жира, ускоренный метод выделения жир и метод без предварительного выделения жира. На практике было

установлено, что для исследования молока и молочной продукции на содержание растительных масел и жиров на растительной основе, предпочтительным методом пробоподготовки является метод с предварительным выделением жира.

В настоящей работе в качестве метода пробоподготовки был выбран метод с предварительным выделением жира. Наилучшее извлечение основных компонентов из жировой фракции обеспечивает гексан, поэтому он был использован в качестве растворителя.

Для сравнительной оценки были взяты несколько образцов.



Оборудование и материалы

- Газовый хроматограф
Хроматэк-Кристалл 5000/9000

- Детектор – МСД
- Колонка BP-5ms (15 м × 0.25 мм × 0.25 мкм)

Режим анализа

Газ-носитель			
Гелий, постоянный поток	1 мл/мин		
Температура колонки			
Изотерма 1:	115 °С	1 мин	5 °С/мин
Изотерма 2:	260 °С	1 мин	5 °С/мин
Изотерма 3:	290 °С		
Испаритель			
Режим ввода пробы	Без деления 1:1		
Температура испарителя	250 °С		
Детектор МСД			
Режим сканирования	50 – 450 а.е.м.		
Температура источника ионов	200 °С		
Температура переходной линии	250 °С		

Градуировка хроматографа

Градуировка хроматографа заключается в определении времени удерживания анализируемых стеринов (приложение А) и выполняется путем анализа рабочего раствора смеси холестерина и фитостеринов по п.8.2.6 в условиях, приведенных в п.8.3 (ГОСТ 33490-2015). Масс-спектрометрический анализ проводят в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) характеристических ионов стеринов.

Экспериментальная часть

Согласно ГОСТ 33490—2015 (1,0 ± 0,1) г жира, выделенного по 8.5.1.8, вносят в коническую колбу вместимостью 150 см³, добавляют 0,3 г гидроокиси натрия, 30 см³ этилового спирта и проводят гидролиз: кипятят с обратным холодильником на электроплитке в течение 60 мин. Содержимое колбы после омыления должно представлять собой однородный прозрачный раствор, который охлаждают в вытяжном шкафу при комнатной температуре до 40 °С. В колбу добавляют 30 см³ дистиллированной воды. Содержимое колбы помещают в делительную воронку вместимостью 250 см³, добавляют 15 см³ н—гексана и экстрагируют неомыляемые вещества, осторожно встряхивая в течение одной минуты. Для лучшего разделения слоев добавляют 2—4 см³ этилового спирта. После

расслоения фаз верхний гексановый слой сливают в коническую колбу, а нижний слой дважды подвергают повторной экстракции с новыми порциями по 15 см³ н—гексана. Гексановые экстракты помещают в делительную воронку. Экстракцию неомыляемых веществ проводят по возможности быстро, предохраняя пробу от попадания на нее прямого солнечного света. Объединенный н—гексановый слой промывают в делительной воронке несколькими порциями по 20 см³ дистиллированной воды 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 на роторном испарителе при температуре (40 ± 5) °С до получения раствора объемом 1,5—2,0 см³ и переносят в виалу.

Результаты и их обсуждение

На рисунке 1 показана хроматограмма анализа напитка на основе молока. Рисунок 2(а-d) – хроматограммы стериновой фракции с их целевыми массами: а – холестерин, b – кампестерин, с – стигмастерин, d – β-ситостерин.

В данном продукте содержится β-ситостерин, это говорит о наличии в продукте растительных жиров, а остальные фитостерины лишь подтверждают факт фальсификации.

На рисунке 3а показана хроматограмма анализа сливочного масла. Рисунок 3b - хроматограмма холестерина с целевой массой. Как видно из хроматограмм, фитостеринов в данном образце нет. Это говорит о том, что данное масло не фальсифицировано.

В таблице 2 приведены концентрации стеринов в растительных маслах в процентах от общей фракции стеринов. Данная таблица является вспомогательной базой при обработке результатов исследований как анализов молока и молочной продукции, так и анализов растительных масел.

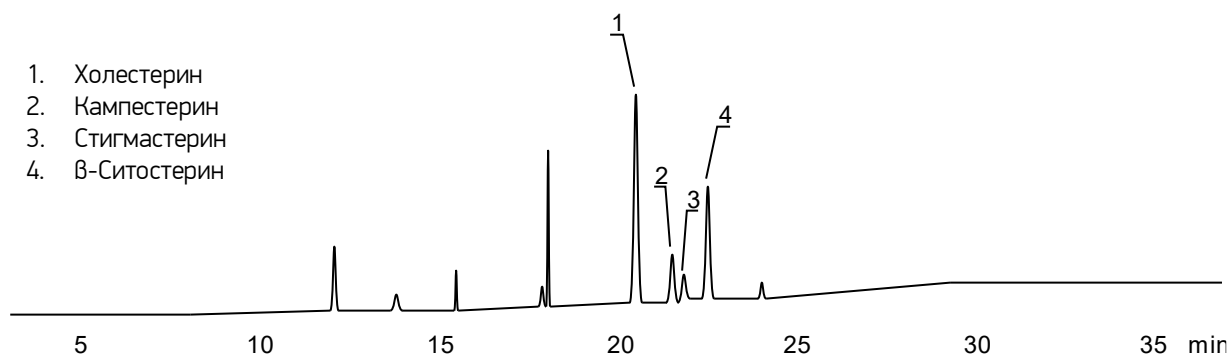


Рисунок 1 – Хроматограмма анализа напитка на основе молока

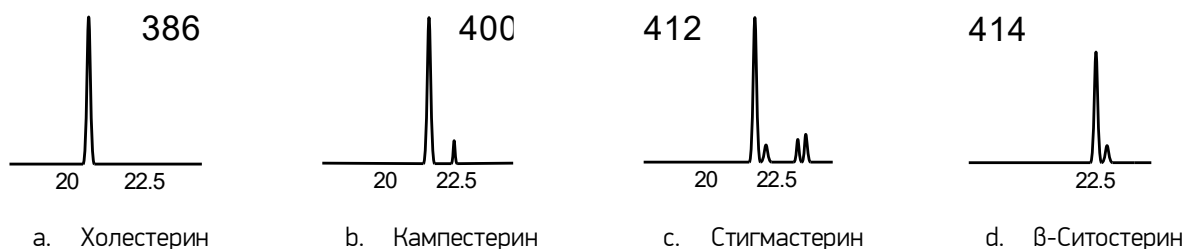


Рисунок 2 – Хроматограммы стериновой фракции с их целевыми массами

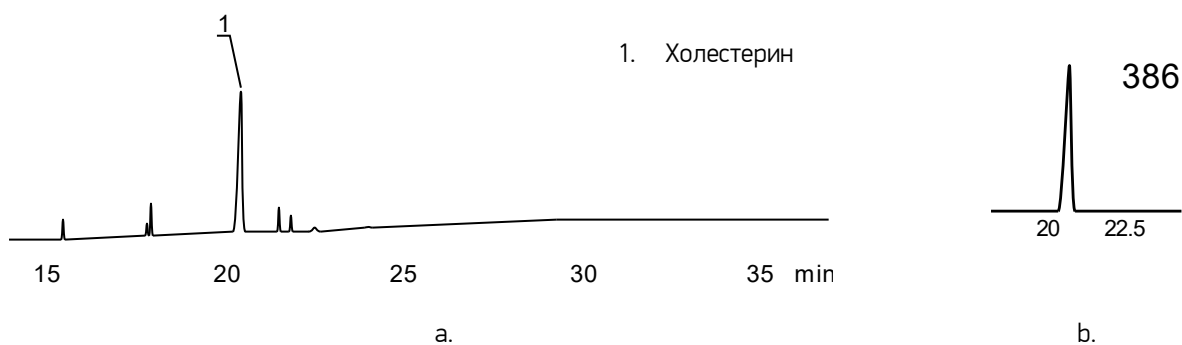


Рисунок 3 – Хроматограммы анализа сливочного масла (а) и холестерина с целевой массой (b)

Масло↓	Холестерин	Брассикастерин	Кампестерин	Стигмастерин	В-ситостерин
Кокосовое	0,6 – 2	0 – 0,9	7 – 10	12 – 18	50 – 70
Кукурузное	0,2 – 0,6	0 – 0,2	18 – 24	4 – 8	55 – 67
Семян хлопка	0,7 – 2,3	0,1 – 0,9	7,2 – 8,4	1,2 – 1,8	80 – 90
Оливковое	0 – 0,5		2,3 – 3,6	0,6 – 2	75,6 – 90
Пальмовое	2,2 – 6,7		18,7 – 29,1	8,9 – 13,9	50,2 – 62,1
Пальмоядровое	1 – 3,7	0 – 0,3	8,4 – 12,7	12,3 – 16,1	62,6 – 70,4
Арахисовое	0,6 – 3,8	0 – 0,2	12 – 20	5 – 13	48 – 65
Рапсовое	0,4 – 2	5 – 13	18 – 39	0 – 0,7	45 – 58
Соевое	0,6 – 1,4	0 – 0,3	16 – 24	16 – 19	52 – 58
Подсолнечное	0,2 – 1,3	0 – 0,2	7 – 13	8 – 11	56 – 63

Таблица 2 – Содержание стеринов в необработанном масле (в процентах от общей фракции стеринов)

Выбор капиллярной колонки

Капиллярную колонку необходимо подбирать с неполярной неподвижной фазой и верхней температурной границей рабочего диапазона не менее 320 °С. Длина и диаметр газохроматографической колонки, толщина слоя

неподвижной фазы должны обеспечивать приемлемое хроматографическое разрешение и число теоретических тарелок для полного разделения стеридов (ГОСТ 33490—2015).

На рисунке 4 представлены хроматограммы анализа сметаны, выполненные на 30 метровой капиллярной колонке CR-5ms (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм). На рисунке 5 – хроматограммы отдельных стеридовых фракций, полученных в режиме SIM и объединенных в одном канале для удобства просмотра и обработки с помощью встроенной функции программы «Хроматэк Аналитик». Как видно из полученных хроматограмм, времена удерживания компонентов исследуемых образцов при использовании 15 метровой колонки уменьшаются, как и время проведения анализов, что в свою очередь способствует большей оперативности выполнения анализов.

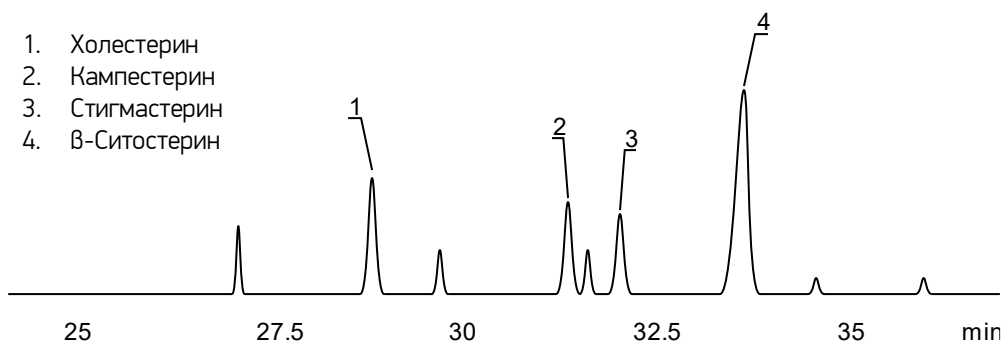


Рисунок 4 – Хроматограмма анализа сметаны

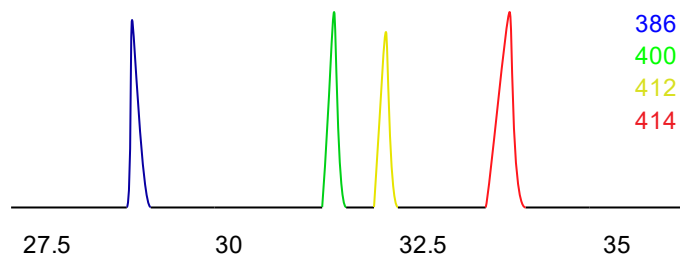


Рисунок 5 – Хроматограммы стеридовых фракций образца сметаны с целевыми массами, объединенные в одном канале

Заключение

Использование газового хроматографа с масс-спектрометрическим детектором и колонкой BP-5ms (15 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) позволяет проводить идентификацию основных компонентов жировой фазы за более короткий промежуток времени чем с использованием колонки CR-5ms (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), которую обычно используют в такого рода исследованиях. Полученные данные позволяют выявлять подлинность молока, молочных продуктов и растительных масел без ущерба для качества получаемых результатов, а так же не нарушая требований изложенных в ГОСТ 33490—2015.

