



Макаренко М.А., Малинкин А.Д., Бессонов В.В.

Метод газовой хроматографии/тандемной масс-спектрометрии с длительной щелочной переэтерификацией для определения сложных эфиров монохлорпропандиолов и глицидола с жирными кислотами в пищевых растительных маслах и жирах

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Москва, Россия

Введение. В статье рассматриваются практические аспекты применения медленной щелочной переэтерификации с последующим определением методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии/масс-спектрометрии ГХ-МС/МС в анализе сложных эфиров 2- и 3-монохлорпропандиола (2-МХПДЭ, 3-МХПДЭ) и жирных кислот, а также глицидиловых эфиров жирных кислот (ГЭ) в пищевых растительных маслах и жирах. Большое количество токсикологических данных, свидетельствующих о потенциальной опасности поступления этих веществ в организм человека с пищей, а также различные ограничения существующих методов свидетельствуют о необходимости расширения методической базы определения 2-МХПДЭ, 3-МХПДЭ и ГЭ.

Материалы и методы. Эфиры 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола в пересчёте на свободную форму определяли методом длительной щелочной переэтерификации и ГХ-МС/МС детектированием.

Результаты. В процессе работы были подобраны оптимальные параметры режима мониторинга множественных реакций (MRM). Использование MRM-режима также позволило повысить селективность метода и улучшить соотношение сигнал/шум относительно SIM-режима работы детектора. Диапазон определяемых концентраций методики в пересчёте на 2- и 3-монохлорпропандиолы (2-МХПД, 3-МХПД) и глицидол (Г) составил 0,3–30 мг/кг для каждого из исследуемых соединений. Полнота извлечения аналитов составила 87,5–113,6%.

Заключение. Принципиальными отличиями предложенного нами метода от стандарта ISO 18363-2:2018, на основе которого первый был разработан, является использование тандемной хромато-масс-спектрометрии для регистрации аналитов и метода абсолютной градуировки с использованием внутреннего стандарта для количественных расчётов. Кроме того, для повышения качества получаемых количественных результатов предлагается вводить в последовательность неизвестных образцов пробу с известной концентрацией аналитов.

Ключевые слова: эфиры 3-монохлорпропандиола; эфиры 2-монохлорпропандиола; глицидиловые эфиры; 3-МХПД; глицидол; ГХ-МС/МС; медленная щелочная переэтерификация; растительные масла; жиры

Для цитирования: Макаренко М.А., Малинкин А.Д., Бессонов В.В. Метод газовой хроматографии/тандемной масс-спектрометрии с длительной щелочной переэтерификацией для определения сложных эфиров монохлорпропандиолов и глицидола с жирными кислотами в пищевых растительных маслах и жирах. *Гигиена и санитария*. 2021; 100 (6): 640-646. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-6-640-646>

Для корреспонденции: Макаренко Мария Андреевна, мл. науч. сотр. лаб. химии пищевых продуктов ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 109240, Москва. E-mail: dragon.soul1992@ya.ru

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Гранта РНФ 19-76-30014 «Фундаментальные исследования паттернов питания человека как основа перспективных технологий производства пищевых продуктов заданного состава и свойств для реализации стратегии здорового питания и профилактики социально значимых заболеваний».

Участие авторов: Макаренко М.А., Малинкин А.Д. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистический анализ, написание текста; Бессонов В.В. – концепция и дизайн исследования. Все соавторы – редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Поступила 15.01.2021 / Принята к печати 10.03.2021 / Опубликована 28.06.2021

Mariia A. Makarenko, Alexey D. Malinkin, Vladimir V. Bessonov

Gas chromatography/tandem mass spectrometry with long-term alkaline transesterification for the determination of esters of monochloropropanediols and glycidol with fatty acids in edible vegetable oils and fats

Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, 109240, Russian Federation

Introduction. The article discusses the method of determination of 2-, 3-monochloropropanediol (2-MCPDE, 3-MCPDE) and glycidyl (GE) fatty acids esters in edible vegetable oils and fats by slow alkaline transesterification and GC-MS/MS. Many toxicological data showed these substances to have the potential for human health risks if consumed; in addition, existing determination methods have various limitations. So, there is a need to expand the variety of 2-MCPDE, 3-MCPDE and GE determination methods.

Materials and methods. 2- and 3-MCPD esters, and glycidyl esters in their corresponding free forms were measured by slow alkaline transesterification with GC-MS/MS.

Results. Multiple reactions monitoring mode parameters were optimized. Compared to SIM operating mode, MRM mode improved the selectivity and increased the signal-to-noise ratio. The method was linear in the range of 0.3 mg/kg - 30.0 mg/kg for each analyte. Recovery, tested in this range, was found to be 87.5%-113.6%.

Conclusion. The method discussed here was based on the ISO 18363-2: 2018 standard. In contrast to the last one, we used tandem chromatography-mass spectrometry to detect analytes and a method of absolute calibration with internal standards to quantitate them. In addition, it is proposed to analyze a spiked sample during the sequence of unknown samples to improve the quality of results.

Keywords: 3-monochloropropanediol esters; 2-monochloropropanediol esters; glycidyl esters; 3-MCPD; glycidol; GC-MS/MS; slow alkaline transesterification; vegetable oils; fats

For citation: Makarenko M.A., Malinkin A.D., Bessonov V.V. Gas chromatography/tandem mass spectrometry with long-term alkaline transesterification for the determination of esters of monochloropropanediols and glycidol with fatty acids in edible vegetable oils and fats. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2021; 100 (6): 640-646. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-6-640-646> (In Russ.)

For correspondence: Mariia A. Makarenko, MD, junior researcher in the laboratory of food chemistry, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, 109240, Russian Federation. E-mail: dragon.soul1992@ya.ru.

Information about authors:

Makarenko M.A., <https://orcid.org/0000-0003-1688-6304>; Malinkin A.D., <https://orcid.org/0000-0002-0370-4500>; Bessonov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3587-5347>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The research was supported by grant of the Russian Science Foundation (project №19-76-30014).

Contribution of the authors: Makarenko M.A., Malinkin A.D. – the concept and design of the study, the collection and processing of the material, statistical analysis, writing a text; Bessonov V.V. – the concept and design of the study. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Received: January 15, 2021 / Accepted: March 10, 2021 / Published: June 28, 2021

Введение

Сложные эфиры монохлорпропандиолов (МХПДЭ) и глицидиловые эфиры (ГЭ) представляют собой группу технологических контаминантов пищевых масел, жиров или жиросодержащих продуктов. Эта группа характеризуется тем, что в её состав входят все возможные варианты сложных эфиров спиртов (Г и МХПД) с различными высшими жирными кислотами, характерными для жирнокислотного состава растительных масел (для МХПДЭ – и структурные изомеры). В небольших количествах МХПДЭ и ГЭ могут содержаться в неочищенных растительных маслах прямого отжима, однако в большей мере их присутствие характерно для очищенных масел и жиров, в частности дезодорированных [1]. Точный механизм образования этих соединений в маслах до конца не установлен, однако известно, что МХПДЭ могут образовываться путём взаимодействия ацилглицеридов и ионов хлора при температурах $> 160\text{ }^{\circ}\text{C}$ [2–4], а ГЭ являются преимущественно продуктами разложения диацилглицеридов (температура $> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$) [1, 5]. Эфиры 2- и 3-монохлорпропандиолов, являясь жироподобными веществами, способны включаться в метаболизм аналогично липидам и терять остатки жирных кислот с образованием 2- и 3-МХПД соответственно [6]. По результатам исследований на лабораторных животных было выявлено, что 3-МХПД может вызывать различные негативные эффекты в организме лабораторных животных, наиболее серьёзными из которых считаются снижение общей плодовитости и гистопатологические изменения яичек у самцов крыс [7]. Влияние 2-МХПД исследовано в меньшей степени, однако авторами [8] были показаны токсические эффекты в поперечно-полосатых мышцах, сердце, почках и печени крыс линии Вистар. Глицидиловые эфиры при поступлении в организм также способны терять остаток жирной кислоты [9]; а высвободившийся глицидол может проявлять мутагенные и генотоксические свойства [1]. Эти данные обусловили включение 3-МХПД и глицидола в список возможных канцерогенов человека (группы 2В и 2А соответственно)¹, а также предложения по нормированию² содержания этих веществ (в виде как спиртов, так и эфиров) в некоторых продуктах, в том числе в пищевых растительных маслах и продуктах на их основе [10].

Пищевые растительные масла и жиры являются одними из основных источников поступления МХПДЭ и ГЭ в организм взрослого человека. Измерение количества этих соединений в таких продуктах возможно как с помощью ВЭЖХ-МС или ВЭЖХ-МС/МС (прямое определение отдельных МХПДЭ и ГЭ), так и методом газовой хроматографии с обычным или тандемным масс-спектрометрическим детектированием [11, 12]. Для рутинного анализа чаще применяют газох-

роматографический метод, поскольку он более универсален и требует меньше стандартных веществ [12]. Общепринятый способ определения заключается в отщеплении жирных кислот с образованием свободных 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола в процессе кислотного или щелочного гидролиза, преобразованием неустойчивого глицидола в более стабильную форму 3-монобромпропандиола и дериватизации полученных аналитов с последующим ГХ-МС анализом. Результат при этом представляют как количество 2-, 3-МХПДЭ и ГЭ в пересчёте на 2-МХПД, 3-МХПД и глицидол соответственно. На данный момент официально зарегистрированы 3 методики определения МХПДЭ и ГЭ, которые отличаются способом и продолжительностью гидролиза. К ним относятся ISO 18363-1:2015³ (гидролиз в щелочной среде, ровно 10 мин), ISO 18363-2:2018⁴ (гидролиз в щелочной среде, не менее 16 ч) и ISO 18363-3:2017⁵ (гидролиз в кислой среде, не менее 16 ч). В России эти документы действуют в виде соответствующих переводных ГОСТов с января 2020 г.^{6,7,8}. Для работы нами был выбран второй вариант методики (щелочной гидролиз в течение 16 ч), поскольку, согласно предварительно проведённому поиску литературы, он обладает рядом преимуществ. Проведение анализа таким способом позволяет избежать побочных реакций взаимопревращений аналитов [13], риска их новообразования в связи с присутствием ионов хлора в исследуемых образцах [14] или погрешностей, связанных с неточным соблюдением времени перезертификации [13]. Кроме того, использование двух проб на один образец позволяет непосредственно измерять глицидол в пробе вместо определения его по разнице³. При этом, однако, для разделения и детектирования аналитов предлагается использовать газохроматографическую систему с моноквадрольным масс-детектором, а количественный анализ выполнять без построения калибровочных кривых, что может снижать

³ ISO 18363-1:2015 Animal and vegetable fats and oils – Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS – Part 1: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 3-MCPD and differential measurement for glycidol.

⁴ ISO 18363-2:2018 Animal and vegetable fats and oils – Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS – Part 2: Method using slow alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol.

⁵ 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.

⁶ ГОСТ Р ИСО 18363-1-2019 Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания сложных эфиров жирных кислот монохлорпропандиолов (МХПД) и глицидола с применением ГХ/МС. Часть 1. Метод с использованием быстрой щелочной перезертификации и измерения содержания 3-МХПД и дифференциальное измерение содержания глицидола.

⁷ ГОСТ Р ИСО 18363-2-2019 Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания сложных эфиров жирных кислот монохлорпропандиолов (МХПД) и глицидола с применением ГХ/МС. Часть 2. Метод с использованием медленной щелочной перезертификации и измерения содержания 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола.

⁸ ГОСТ Р ИСО 18363-3-2019 Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания сложных эфиров жирных кислот монохлорпропандиолов (МХПД) и глицидола с применением ГХ/МС. Часть 3. Метод с использованием кислотной перезертификации и измерения содержания 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола.

¹ Agents Classified by the IARC Monographs / FAO/WHO // Vol. 1–123. Доступно по: https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/List_of_Classifications.pdf (дата обращения: 25.08.2020 г.).

² Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). С изменениями, принятыми Коллегией Евразийской экономической комиссии от 06.08.2019 г. № 132.

точность определения. В целях расширения методической базы, оптимизации подготовки проб и проведения измерений нами был предложен собственный вариант определения содержания эфиров монохлорпропандиолов и глицидола в пищевых растительных маслах и жирах методом ГХ-МС/МС с предварительной длительной щелочной переэтерификацией.

Материалы и методы

Реактивы. Стандартные вещества: 3-монохлорпропан-1,2-диол (3-МХПД); 3-монобромпропан-1,2-диол (3-МБПД), 3-монобромпропан-1,2-диол-1,1,2,3,3-D5 (3-МБПД-D5), 1,2-дипальмитоил-3-монохлорпропандиол-1,1,2,3,3-D5 (1,2-ПП-3-МХПД-D5), 1,3-дипальмитоил-2-монохлорпропандиол-1,1,2,3,3-D5 (1,3-ПП-2-МХПД-D5), 1,2-дипальмитоил-3-монохлорпропандиол (1,2-ПП-3-МХПД), 1,3-дипальмитоил-2-монохлорпропандиол (1,3-ПП-2-МХПД), глицидил пальмитат, кислота фенилборная (ФБК) (Toronto Research Chemicals); 3-монохлорпропан-1,2-диол-1,1,2,3,3-D5 (3-МХПД-D5) (Sigma-Aldrich). Растворители и реактивы: метанол, толуол, изооктан (все для ВЭЖХ); вода, очищенная в системе MilliQ; натрия гидроксид, эфир диэтиловый, этилацетат, натрий бромистый, гексан, кислота ортофосфорная (все х. ч.), универсальная индикаторная бумага; гелий (степень чистоты не менее 99,9999%).

Оборудование. Центрифужный концентратор Vacufuge plus (Eppendorf), орбитальный шейкер IKA-WERK VF2, ультразвуковая ванна SONOREX (Bandelin), центрифуга для микропробирок Centrifuge-5424 (Eppendorf), весы неавтоматического действия GR-120 (AND), газовый хроматограф Agilent Technologies 7890A с автоматическим пробоотборником и тройным квадрупольным масс-селективным детектором Agilent Technologies 7000C (США). Использовалась хроматографическая колонка HP-5 MS 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм (Agilent, США).

Объекты исследования. Работоспособность методики оценивали на примере нерафинированного оливкового масла первого отжима, в котором было предварительно определено содержание эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в пересчёте на свободную форму менее 0,01 мг/кг каждого. Для приготовления проб с известной концентрацией в это масло вносили 1,2-дипальмитат-3-МХПД, 1,3-дипальмитат-2-МХПД и глицидол пальмитат в толуоле так, чтобы конечная эквивалентная концентрация свободных 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в полученной смеси составляла 1 мг/кг.

Подготовка проб. Около 100 мг масла помещали в две пробирки на 15 мл (пробы А и Б). К пробе А добавляли по 50 мкл растворов 3-МХПД-D5 и 3-МБПД-D5 концентрацией каждого 10 мг/мл в метаноле. В пробу Б вносили 100 мкл совместного раствора 1,2-ПП-3-МХПД-D5 и 1,3-ПП-2-МХПД-D5 с концентрацией каждого 5 мг/мл в толуоле. Далее подготовка проб А и Б не отличалась. К пробам добавляли 600 мкл диэтилового эфира, интенсивно перемешивали и помещали в морозильную камеру (-25 °С) на 30 мин. Затем, не размораживая пробы, вносили 500 мкл NaOH в метаноле (концентрация 2,5 г/мл) и снова помещали в морозильную камеру (-25 °С) на ≥ 16 ч. После этого, строго не размораживая пробы, вносили 600 мкл подкисленного водного раствора бромид натрия (55%-й водный раствор NaBr, подкисленный 330 мкл концентрированной H₃PO₄) и перемешивали. Затем верхний эфирный слой упаривали на микроцентрифужном концентраторе без нагревания. К оставшемуся нижнему слою добавляли 600 мкл гексана, перемешивали и после разделения фаз верхний слой удаляли. Промывку повторяли. Затем к пробам добавляли 900 мкл смеси диэтиловый эфир: этилацетат (4:6 по объёму), перемешивали и дожидались разделения фаз. После этого верхний слой переносили в другие пробирки на 15 мл. Экстракцию повторяли. Затем объединённые экстракты упаривали без нагревания. После этого в пробы вносили 1 мл раствора ФБК (2%-й раствор фенилборной кислоты в 0,2%-м растворе очищенной воды в диэтило-

вом эфире), ждали не менее 15 мин, и затем пробы упаривали без нагревания досуха. К пробам приливали 1 мл изооктана, осадок разбивали с помощью ультразвуковой ванны и вместе с изооктаном переносили в микропробирки на 2 мл. Микропробирки центрифугировали при 14 500 rpm 5 мин, затем 200 мкл чистой надосадочной жидкости отбирали в вials для ГХ.

Условия разделения и детектирования аналитов. Использовали следующие параметры работы хромато-масс-спектрометра: начальная температура работы термостата 60 °С, затем подъём со скоростью 5 °С/мин до 190 °С, затем подъём со скоростью 20 °С/мин до 280 °С, задержка 5 мин, по окончании 300 °С 5 мин. Температура инжектора 250 °С, режим работы без деления потока, вводимый объём пробы 1 мм³. Газ-носитель гелий, скорость потока 1,2 мл/мин в постоянном режиме. Температура интерфейса 280 °С, температура источника 230 °С, температура квадрупольа 150 °С. Тройной квадруполь настраивали для работы в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Для этого использовали подобранные параметры переходов и энергий соударения, представленные в разделе «Результаты» в табл. 3.

Расчёты и обработка результатов. Расчёт содержания аналитов в образце проводился по следующим формулам:

$$C_{3\text{-МХПД}(a)} = \frac{G_1 \cdot 0,6}{m},$$

где $C_{3\text{-МХПД}(a)}$ — содержание 3-МХПД в пробе А, мкг/г; G_1 — масса 3-МХПД во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе А, рассчитанная по градуировке, мкг; m — масса навески образца, г.

$$C_{\text{глицидола}(a)} = \frac{G_2 \cdot 0,6}{m},$$

где $C_{\text{глицидола}(a)}$ — содержание глицидола в пробе А, мкг/г; G_2 — масса глицидола во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе А, рассчитанная по градуировке, мкг.

$$C_{3\text{-МХПД}(b)} = \frac{G_3 \cdot 0,6}{m},$$

где $C_{3\text{-МХПД}(b)}$ — содержание 3-МХПД в пробе Б, мкг/г; G_3 — масса 3-МХПД во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе Б, рассчитанная по градуировке, мкг.

$$C_{2\text{-МХПД}(b)} = \frac{G_4 \cdot 0,6}{m},$$

где $C_{2\text{-МХПД}(b)}$ — содержание 2-МХПД в пробе Б, мкг/г; G_4 — масса 2-МХПД во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе Б, рассчитанная по градуировке, мкг.

$$C_{\text{глицидола}(b)} = \frac{G_3 - \text{МХПД}(b)}{G_3 - \text{МХПД}(a)} \cdot C_{\text{глицидола}(a)},$$

где $C_{\text{глицидола}(b)}$ — содержание глицидола в пробе Б, мкг/г.

Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.06.00 и Agilent MassHunter Quantitative Analysis B.06.00, обработку результатов проводили в Microsoft Excel 2010.

Результаты

Международный стандарт ISO 18363-2:2018⁹ является одним из трёх основных вариантов непрямого определения эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидиловых эфиров в пищевых маслах и жирах в виде 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола. Он предполагает использование моноквадрупольного детектора для идентификации этих соединений, при этом

⁹ ISO 18363-2:2018 Animal and vegetable fats and oils – Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS – Part 2: Method using slow alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol.

Таблица 1 / Table 1

Сравнение стандартного (ISO 18363-2:2018) и нового вариантов подготовки проб и проведения измерений
Comparison of standard (ISO 18363-2:2018) and used sample preparation and detection versions

Выполнение согласно ISO 18363-2:2018 Procedure according to ISO 18363-2:2018	Выполнение согласно предложенному варианту Procedure in this work	Результат Result
Растворы стандартов 1,3-дипальмитат-2-МХПД-D5 и стандарта 1,2-дипальмитат-3-МХПД-D5 готовятся отдельно Individual standard solutions for 1,3-bipalmitate-2-MCPD-d5 and 1,2-bipalmitate-3-MCPD-d5 are prepared	Готовят совместный раствор стандартов 1,3-дипальмитат-2-МХПД-D5 и 1,2-дипальмитат-3-МХПД-D5 Mixed solution of 1,3-bipalmitate-2-MCPD-d5 and 1,2-bipalmitate-3-MCPD-d5 is prepared	Уменьшение времени подготовки проб Reduction in sample preparation time
Экстракцию аналитов проводят 3 раза, добавляя по 600 мкл смеси диэтиловый эфир/этилацетат Analytes are extracted by 3 times washing the sample with 600 µl of diethyl ether/ethyl acetate mixture	Экстракцию аналитов проводят 2 раза, добавляя по 900 мкл смеси диэтиловый эфир/этилацетат Analytes are extracted by 2 times washing the sample with 900 µl of diethyl ether/ethyl acetate mixture	Уменьшение времени подготовки проб Reduction in sample preparation time
Моноквадруполь, SIM-режим регистрации ионов Single quad detector, SIM ion detection mode	Тройной квадруполь, MRM-режим регистрации ионов Triple quadrupole, MRM ion detection mode	Повышение селективности The gain in selectivity
Расчёт содержания аналитов без использования градуировки Calibration curves use is optional	Расчёт содержания аналитов по градуировочным кривым Calibration curves use is required	Корректировка показаний детектора Increased accuracy

их количественный анализ выполняется без построения соответствующих градуировочных кривых. В этой работе вместо моноквадрупольного детектора и режима мониторинга выбранных ионов (SIM-режим) использовали тройной квадрупольный детектор и режим мониторинга множественных реакций (MRM). Помимо этого в процедуру был внесён ряд других изменений, которые представлены в табл. 1.

В процессе проведения исследования была изучена возможность использования tandemного масс-спектрометрического детектирования. Пары предшествующих ионов и ионов-фрагментов и подобранные энергии соударения представлены в табл. 2.

Было проведено сравнение результатов при использовании режима мониторинга выбранного иона (SIM), согласно ISO 18363-2:2018, и режима мониторинга переходов масс (MRM). Примеры полученных хроматограмм в SIM- и MRM-режимах представлены на рис. 1.

Использование более селективного режима работы детектора масс позволило значительно улучшить соотношение сигнал/шум, что продемонстрировано в табл. 3.

Из представленных данных видно, что по сравнению с SIM-режимом в режиме мониторинга переходов масс практически отсутствуют сторонние пики (см. рис. 1), а соотношение сигнал/шум в случае 3-МБПД и его дейтерированного аналога возросло на порядок, в случае 2-МХПД и 3-МХПД-D5 на 2 порядка, 3-МХПД – на 4 порядка.

Для проведения количественного анализа был выбран метод абсолютной градуировки с использованием внутреннего стандарта. Для построения градуировочных графиков готовили по 6 совместных разведений 3-МХПД и глицидола в метаноле с концентрациями 0,01; 0,05; 0,2; 0,5; 2; 5 мг/кг и по 6 совместных разведений 1,2-дипальмитат-3-МХПД и 1,3-дипальмитат-2-МХПД с концентрациями, эквивалентными содержанию свобод-

Таблица 2 / Table 2

Пример параметров режима мониторинга

Examples of mode settings for monitoring selected reactions

Аналит Analyte	Ион-предшественник, m/z Precursor ion, m/z	Ион-фрагмент, m/z Fragment ion, m/z	Энергия соударения, eV Collision energy, eV	Временной сегмент, мин Time range, min
3-МХПД*	3-MCPD*	196	147	10
3-МХПД	3-MCPD	196	91	25
3-МХПД-D5*	3-MCPD-D5*	201	150	10
3-МХПД-D5	3-MCPD-D5	201	93	25
2-МХПД*	2-MCPD*	196	104	25
2-МХПД	2-MCPD	196	91	15
2-МХПД-D5*	2-MCPD-D5*	201	107	10
2-МХПД-D5	2-MCPD-D5	201	104	20
3-МБПД*	3-MBPD*	242	147	10
3-МБПД	3-MBPD	242	91	25
3-МБПД-D5*	3-MBPD-D5*	247	150	10
3-МБПД-D5	3-MBPD-D5	247	93	25

Примечание. * – отмеченные пары ионов использовались для количественного расчёта, остальные – в качестве подтверждающих.

Note. * – Ion pairs of analytes marketed with were used to quantitate, and the others were used as qualifiers.

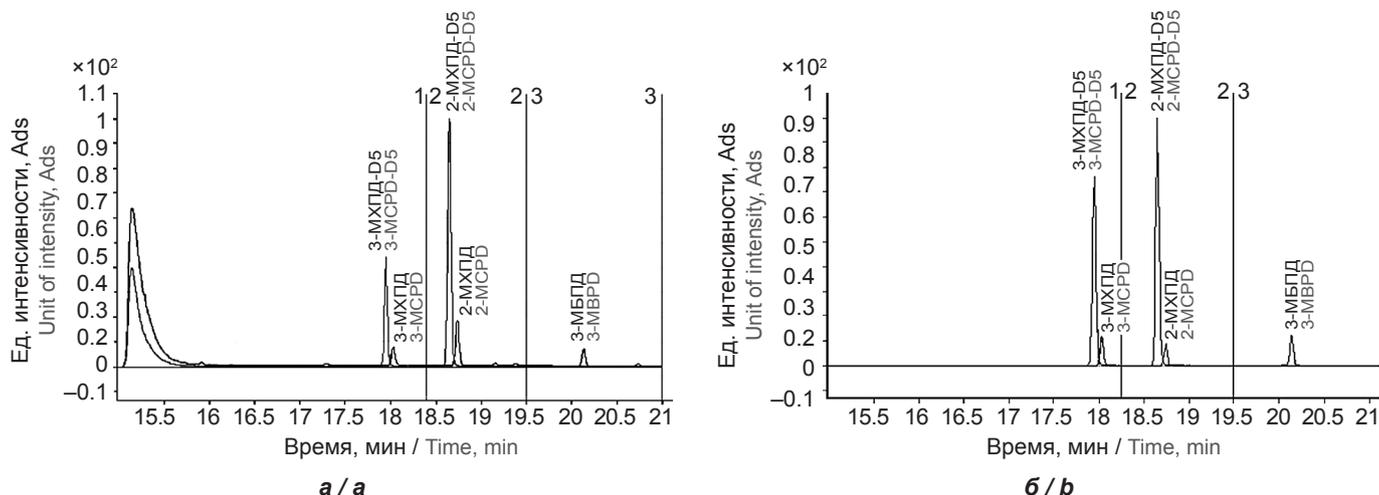


Рис. 1. Сравнение хроматограмм контрольной пробы оливкового масла с добавлением 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола (проба Б), полученных в SIM- и MRM-режимах работы тройного квадрупольного детектора: а – SIM-режим; б – MRM-режим (проба Б).

Fig. 1. Chromatograms of known amount of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol (3-MBPD) in spiked olive oil (Assay B) obtained by triple quadrupole in SIM and MRM operation modes: a – SIM mode; б – MRM mode.

Таблица 3 / Table 3

Сравнение соотношения сигнал/шум в разных режимах работы тройного квадрупольного

Signal-to-noise ratio comparison in triple quadrupole operation modes used

Аналит Analyte	Отклик детектора Signal-to-noise ratio	
	в SIM-режиме in SIM mode	в MRM-режиме in MRM mode
3-МХПД**	7.5	26 501.4
3-МСПД**	(m/z 196)	(196→147)
3-МХПД-D5**	415.4	28 696.6
3-МСПД-D5**	(m/z 201)	(201→150)
2-МХПД**	18.6	3956.0
2-МСПД**	(m/z 196)	(196→104)
2-МХПД-D5**	941.7	1099.4
2-МСПД-D5**	(m/z 201)	(201→107)
3-МБПД	63.5	778.4
3-МВРД	(m/z 242)	(242→147)
3-МБПД-D5	309.9	11 76.5
3-МВРД-D5	(m/z 247)	(247→150)

Примечание. ** – расчёт по хроматограмме пробы Б.

Note. ** Values obtained from sample B.

ных 3-МХПД и 2-МХПД: 0,01; 0,05; 0,2; 0,5; 2; 5 мг/кг соответственно в толуоле. Пример градуировочного графика для 1,2-дипальмитоил-3-МХПД представлен на рис. 2. Коэффициенты достоверности аппроксимации составили: для 3-МХПД $R^2 = 0,994$, глицидола в форме 3-МБПД $R^2 = 0,989$, 1,2-дипальмитоил-3-МХПД в форме 3-МХПД $R^2 = 0,999$, 1,3-дипальмитоил-2-МХПД в форме 2-МХПД $R^2 = 0,998$.

Стабильность работы детектора оценивали на протяжении 7 мес путём исследования контрольных проб с известной концентрацией аналитов (табл. 4). Из представленных результатов видно, что найденное количество 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола иногда существенно отличалось от добавленного.

Таким образом, для контроля работы детектора и адекватности градуировочного графика целесообразным пред-

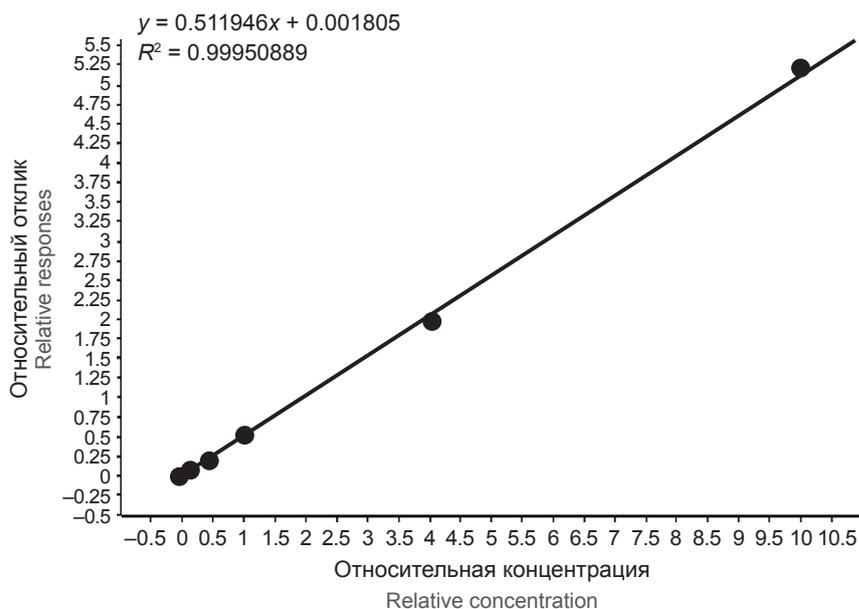


Рис. 2. Градуировочный график 1,2-ПП-3-МХПД в форме 3-МХПД, коэффициент взвешивания $k_b = 1/x$.

Fig. 2. Calibration curve of 1,2-bis(sn)-3-MCPD as 3-MCPD, weighting coefficient $k_b = 1/x$.

ставляется анализ контрольных проб в каждой последовательности неизвестных образцов.

Оценка метрологических параметров методики проводилась по ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002¹⁰, РМГ 61-2010¹¹, РМГ 76-2014¹², результаты представлены в табл. 5.

В исследуемом диапазоне концентраций наибольшая величина погрешности определения была установлена для глицидола. Объясняется это тем, что окончательный резуль-

¹⁰ ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения.

¹¹ РМГ 61-2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки.

¹² РМГ 76-2014 ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

Таблица 4 / Table 4

Измеренное содержание 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола в контрольных пробах с внесённой концентрацией каждого аналита 1 мг/кг. Результаты представлены в виде среднего \pm ошибка метода ($Me \pm \delta$)

Measured 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol content in spiked olive oil with calculated concentration 1 mg/kg of each analyte. Results are shown as mean \pm method error

Дата изготовления контрольной пробы Spiked sample preparation date	Дата проведения измерения Measurement execution date	Концентрация измеренная, мг/кг Measured concentration, mg/kg		
		3-МХПД 3-MCPD	2-МХПД 2-MCPD	глицидол glycidol
22.07.2019	19.08.2019	0.99 \pm 0.49	0.76 \pm 0.26	0.91 \pm 0.63
	22.08.2019	0.96 \pm 0.48	0.60 \pm 0.21	1.05 \pm 0.72
	04.09.2019	0.93 \pm 0.46	0.59 \pm 0.41	0.80 \pm 0.28
26.09.2019	26.09.2019	0.90 \pm 0.45	0.90 \pm 0.32	0.84 \pm 0.58
03.12.2019	05.12.2019	0.84 \pm 0.42	0.81 \pm 0.28	0.78 \pm 0.54
	12.12.2019	0.97 \pm 0.48	0.87 \pm 0.30	1.25 \pm 0.86
	23.12.2019	0.91 \pm 0.46	0.81 \pm 0.28	0.58 \pm 0.40
17.02.2020	17.02.2020	0.98 \pm 0.49	1.02 \pm 0.36	0.71 \pm 0.49
03.03.2020	03.03.2020	0.91 \pm 0.46	0.89 \pm 0.31	0.74 \pm 0.51
05.03.2020	05.03.2020	0.99 \pm 0.46	0.82 \pm 0.29	0.73 \pm 0.51
10.03.2020	13.03.2020	0.97 \pm 0.48	0.94 \pm 0.33	0.75 \pm 0.52
	18.03.2020	0.84 \pm 0.42	0.95 \pm 0.33	0.97 \pm 0.67

Таблица 5 / Table 5

Метрологические характеристики методики определения 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола методом ГХ-МС/МС

Validation parameters for the method of GC-MS/MS determination of 2-MCPD, 3-MCPD, and glycidol

Аналит Analyte	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг The range, mg/kg	Границы относительной погрешности ($p = 0,95$), $\pm \delta$, % Relative error ($p = 0,95$), $\pm \delta$, %	Средняя полнота извлечения вещества, % Recovery rate, %
3-МХПД 3-MCPD	0.30–30.0	50	113.6
2-МХПД 2-MCPD	0.30–30.0	35	107.9
Глицидол Glycidol	0.30–30.0	69	87.5

тат по глицидолу рассчитывается исходя из соотношения содержания 3-МХПД в пробах А и Б, то есть данные погрешности влияют на итоговую погрешность при определении содержания глицидола. При этом средняя полнота извлечения всех исследуемых соединений находилась в диапазоне 80–120%. Таким образом, методика измерения содержания эфиров монохлорпропандиолов и глицидола может быть применена для исследования реальных образцов пищевых масел и жиров.

Обсуждение

Использование моноквадрупольного детектора и отсутствие необходимости построения градуировочной кривой упрощает, ускоряет и делает менее дорогим рутинное определение сложных эфиров МХПД и эфиров глицидола. Такой подход наиболее оправдан для лабораторий, работающих с серийными образцами, которые мало отличаются составом и способом обработки: например, при входном контроле масложирового сырья, контроле производственных процессов и проверке качества готовой продукции в заводских лабораториях.

В любом случае для обеспечения качества результатов, получаемых методами с применением моноквадрупольного детектора, необходимо проведение периодического контроля правильности работы такого детектора и точности

получаемых результатов. В то же время при проведении исследований образцов несерийных, с неизвестным составом и технологией изготовления, возникает необходимость постоянного контроля точности результатов в каждой серии образцов.

Описанная нами процедура исследования содержания сложных эфиров МХПД и эфиров глицидола с использованием тройного квадрупольного детектора основана на принципе постоянного контроля точности получаемых результатов, что усложняет анализ, но позволяет без подготовительных процедур изучать жировые образцы любого состава и происхождения. Использование режима MRM позволило количественно определять концентрации всех аналитов до 0,3 мг/кг и снизить вероятность ошибок идентификации и количественного определения, встречающихся при использовании SIM-режима работы масс-детектора [15]. Дополнительной мерой контроля правильности анализа является использование пробы известного состава и концентрации аналитов в каждой последовательности проб. Это даёт возможность своевременно отследить неточности в работе прибора или оператора и в некоторых случаях компенсировать их путём пересчёта полученных результатов.

Дальнейшая оптимизация метода может быть достигнута путём снижения нижней границы диапазона определяемых концентраций до 0,06 мг/кг и введения в расчёты поправки на соотношение найденного содержания каждого аналита к

добавленному в контрольной пробе. Кроме того, логичной представляется замена внутреннего стандарта 3-МХПД-D5 на 3-МХПД-C13, что позволит использовать одну пробу вместо двух на один образец для контроля возможного новообразования глицидола.

Следует отметить, что, согласно используемым в разработанной методике расчётам, окончательная величина содержания глицидола в пробе зависит от соотношения содержаний 3-МХПД в пробах А и Б. В норме это соотношение должно быть близко к единице, однако при возникновении побочных или нежелательных реакций в пробе или других проблем это соотношение может меняться, что может снизить правильность определения глицидола.

Заключение

Таким образом, разработанный вариант методики определения сложных эфиров 2-МХПД, 3-МХПД и глицидиловых эфиров методом длительной щелочной переэтерификации с ГХ-МС/МС-детектированием позволяет проводить определение этих веществ в диапазоне 0,3–30 мг/кг. Методика может быть использована для контроля содержания глицидиловых эфиров в пересчёте на глицидол как нормируемого показателя в пищевых растительных маслах и животных жирах, которые предназначены для реализации на рынках как в качестве готовых продуктов, так и ингредиентов, в том числе для производства детского питания.

Литература

(п.п. 1–9, 11–15 см. References)

10. Макаренко М.А., Малинкин А.Д., Боков Д.О., Бессонов В.В. Монохлорпропандиолы, глицидол и их эфиры в детском питании. *Вопросы детской диетологии*. 2019; 17(1): 38–48. <https://doi.org/10.20953/1727-5784-2019-1-38-48>

References

- Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA J.* 2016; 14(5): 4426. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4426>
- Gao B., Li Y., Huang G., Yu L. Fatty Acid Esters of 3-Monochloropropanediol: A Review. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2019; 10(1): 259–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121245>
- Tiong S.H., Saparin N., Teh H.F., Ng T.L.M., Zain M.Z.B., Neoh B.K., et al. Natural organochlorines as precursors of 3-monochloropropanediol esters in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* 2018; 66(4): 999–1007. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04995>
- Hrnčirik K., van Duijn G. An initial study on the formation of 3-MCPD esters during oil refining. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011; 113: 374–9. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000317>
- Weißhaar R., Perz R. Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010; 112: 158–65. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900137>
- Jędrkiewicz R., Kupka M., Głowacz A., Gromadzka J., Namieśnik J. 3-MCPD: A worldwide problem of food chemistry. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 2016; 56(14): 2268–77. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.829414>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutson H.K., Alexander J., Barregård L., Bignami M., Brüschweiler B., Ceccatelli S., et al. Update of the risk assessment on 3-monochloropropane diol and its fatty acid esters. *EFSA J.* 2018; 16(1): 5083. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5083>
- Schultrich K., Frenzel F., Oberemm A., Buhrke T., Braeuning A., Lampen A. Comparative proteomic analysis of 2-MCPD- and 3-MCPD-induced heart toxicity in the rat. *Arch. Toxicol.* 2017; 91(9): 3145–55. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1927-0>
- Appel K.E., Abraham K., Berger-Preiss E., Hansen T., Apel E., Schuchardt S., et al. Relative oral bioavailability of glycidol from glycidyl fatty acid esters in rats. *Arch. Toxicol.* 2013; 87(9): 1649–59. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1061-1>
- Макаренко М.А., Малинкин А.Д., Боков Д.О., Бессонов В.В. Монохлорпропандиолы, глицидол и их эфиры в детском питании. *Вопросы детской диетологии*. 2019; 17(1): 38–48. <https://doi.org/10.20953/1727-5784-2019-1-38-48> (in Russian)
- Zelinkova Z., Giri A., Wenzl T. Assessment of critical steps of a GC/MS based indirect analytical method for the determination of fatty acid esters of monochloropropanediols (MCPDEs) and of glycidol (GEs). *Food Control.* 2017; 77: 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.024>
- Crews C., Chiodini A., Granvogl M., Hamlet C., Hrnčirik K., Kuhlmann J., et al. Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: A review and future perspectives. *Food Addit. Contam., Part A.* 2012; 30(1): 11–45. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.720385>
- Kuhlmann J. Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011; 113: 335–44. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000313>
- Weißhaar R. Determination of total 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008; 110: 183–6. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700197>
- Goh K.M., Wong Y.H., Ang M.Y., Yeo S.C.M., Abas F., Lai O.M., et al. Comparison assessment between SIM and MRM mode in the analysis of 3-MCPD ester, 2-MCPD ester and glycidyl ester. *Food Res. Int.* 2019; 121: 553–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.013>