

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им В.М. Горбатова»



Хроматографические методы в практике пищевой лаборатории

Куликовский Андрей Владимирович, к.т.н.
в.н.с. лаборатории НМРБиАИ
a.kulikovskii@fncps.ru



Определение содержания жирорастворимых витаминов с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии(ВЭЖХ)

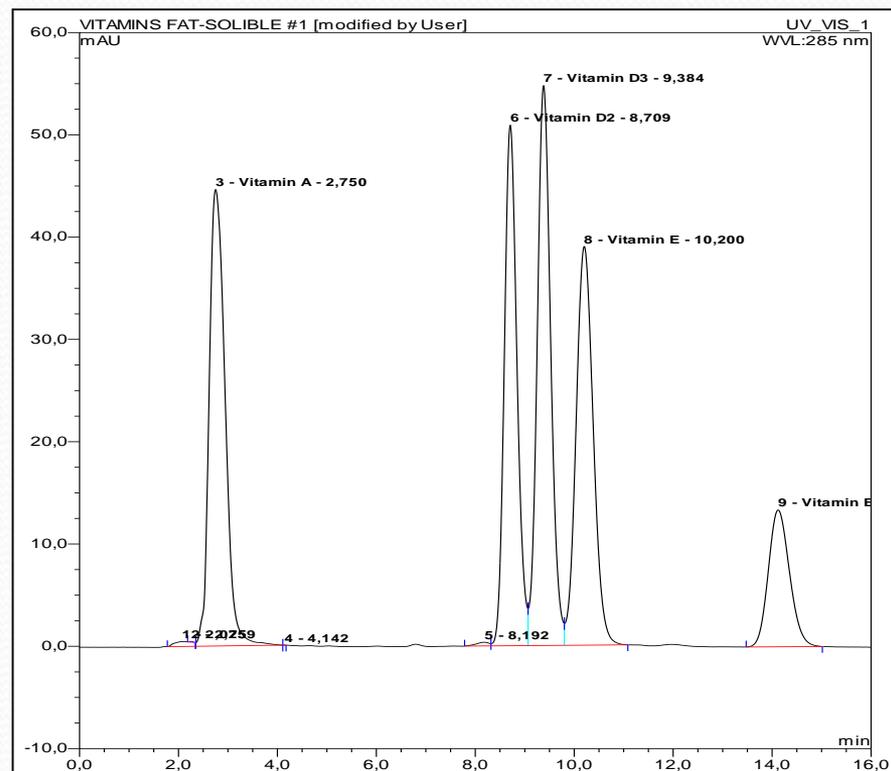
В результате щелочного гидролиза пробы, происходит гидролиз жира, освобождение витаминов из клеток, гидролиз всех форм витаминов А,Е (пальмитаты и ацетаты) до свободной формы. Последующая экстракция жирорастворимых витаминов диэтиловым эфиром, выпаривании эфира и растворении остатка в подвижной фазе, позволяет многократно сконцентрировать искомые витамины.

ГОСТ 32307–2013 Мясо и мясные продукты. Определение содержания жирорастворимых витаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

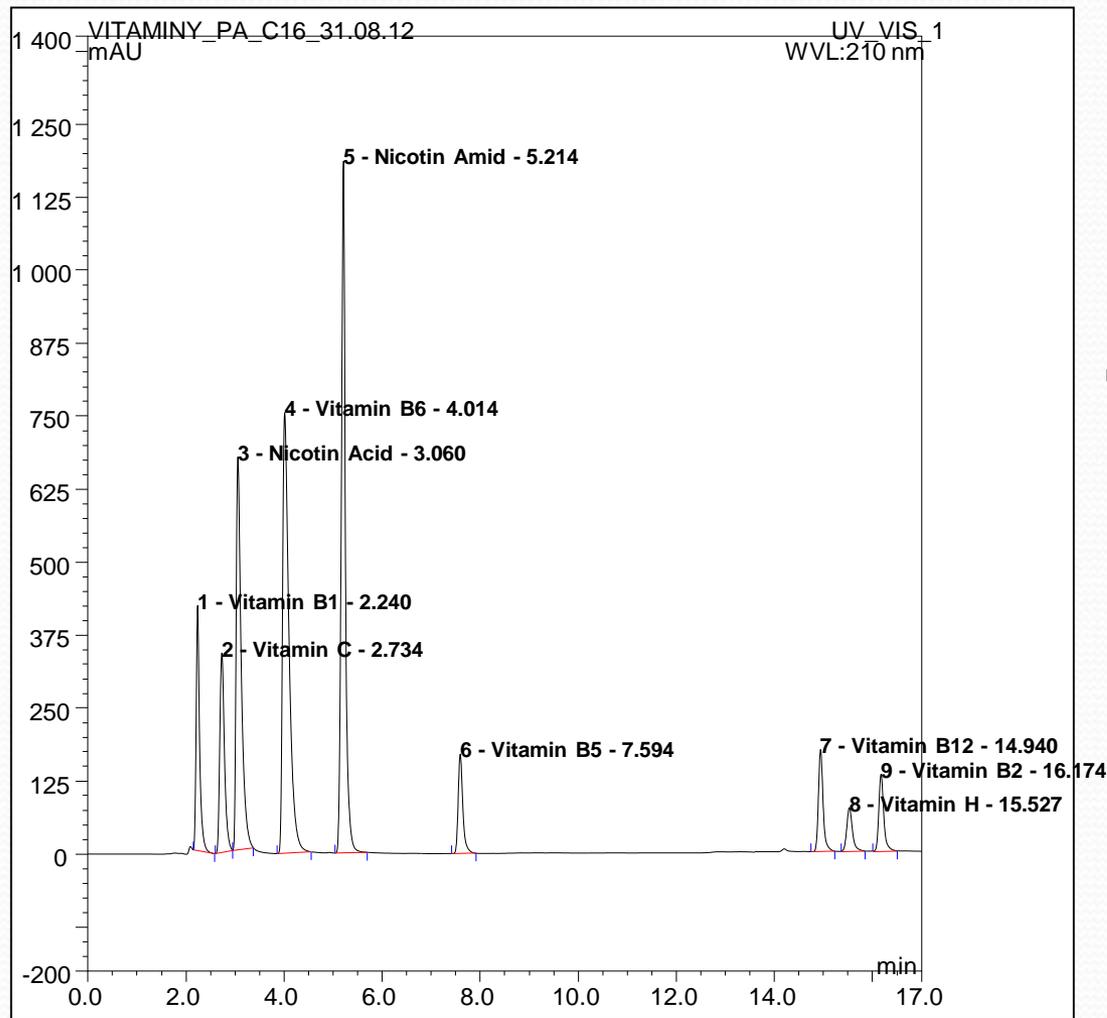
Использование агидола в качестве антиоксиданта предотвращает разрушение витаминов.

Подобранные длины волн УФ детектора для каждого витамина позволяют снизить предел обнаружения и снижает возможность ложноположительных результатов, в случае присутствия в пробах веществ, дающих перекрестные сигналы.

Использование специализированных хроматографических колонок, дает возможность селективного разделения эргокальциферола (D2) и холекальциферола(D3), с высокими показателями эффективности.



Хроматограмма разделения водорастворимых витаминов на колонке C16



Колонка: Acclaim PA (C16), 5 μ m
Элюент: градиент ацетонитрил-фосфатный буфер pH3.4
Температура: 30 °C
Скорость потока: 1.0 мл/мин
Детектирование: 210 нм

ГОСТ Р 55482-2013 Мясо и мясные продукты. Метод определения содержания водорастворимых витаминов



Система ВЭЖХ для анализа аминокислотного состава и углеводов

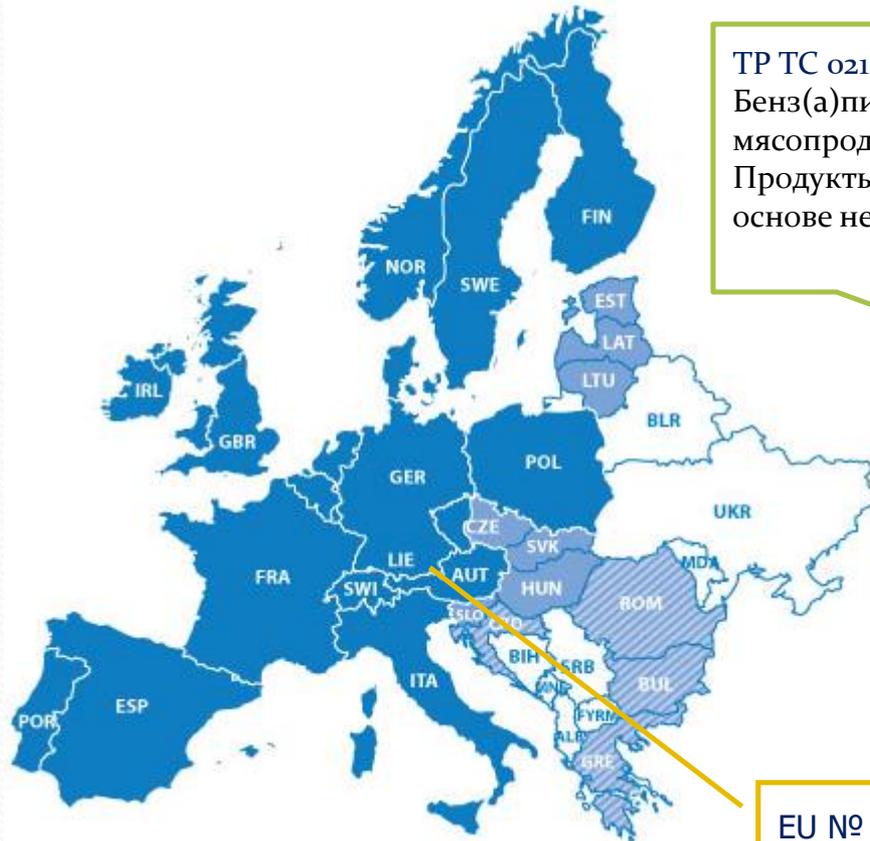


- Метод основан на дериватизации аминокислот ортофталевым альдегидом дальнейшей идентификации в UV спектре на обращено-фазной хроматографической колонке C18. Интегрированный рефрактометрический детектор позволяет определять углеводный состав (лактоза, глюкоза, сахароза, фруктоза и т.д.)

ГОСТ 34132-2017 МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ Метод определения аминокислотного состава животного белка

ГОСТ 34134 -2017 МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ Метод определения состава свободных углеводов

Анализ нормативной базы и аналитических методов в РФ и Европе



ТР ТС 021/2011

Бенз(а)пирен – не более 1 мкг\кг на мясо и мясопродукты

Продукты детского питания на зерновой основе не более 0,2 мкг\кг

ГОСТ 31745-2012 Продукты пищевые. Определение содержания полициклических ароматических углеводородов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

ГОСТ Р 51650-2000 Продукты пищевые. Методы определения массовой доли бенз(а)пирена.

МУ 4721-88 Методические указания по выделению, идентификации и количественному определению насыщенных, моно-, би-, три- и ряда полициклических ароматических углеводородов в пищевых продуктах.

БСТ-МВИ-03-03 Методика определения бенз(а)пирена в продовольственном сырье, пищевых продуктах и почве.

EU № 1881/2006 EU № 835/2011

Бенз(а)пирен не более 5 мкг\кг на мясо и мясопродукты (с 31.08.2014 – 2мкг\кг).

С 01.09.2012 сумма бенз(а)пирена, бенз(а)антрацена, бензо(б)флуорантрена и хризена 30 мкг\кг, а с 01.09.2014 12 мкг\кг.

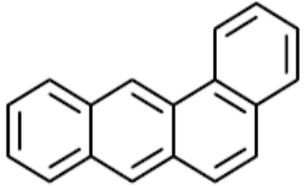
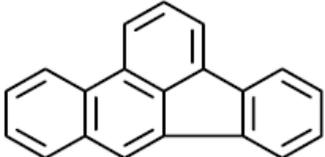
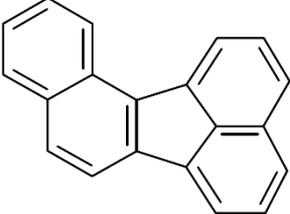
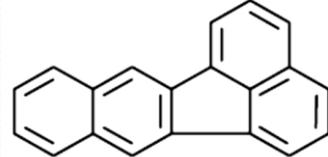
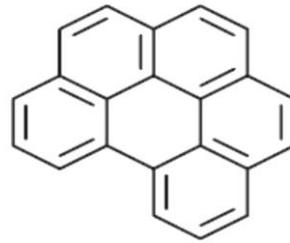
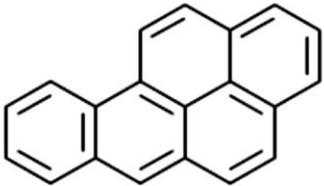
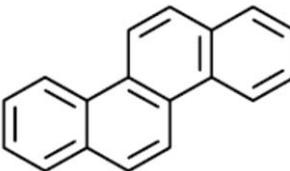
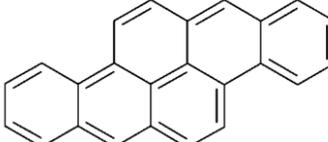
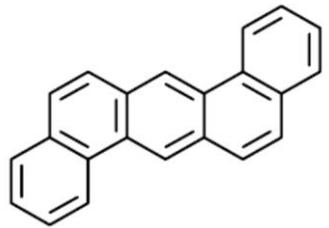
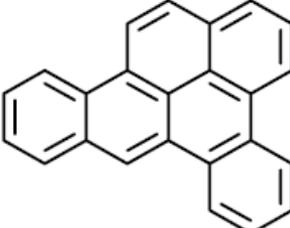
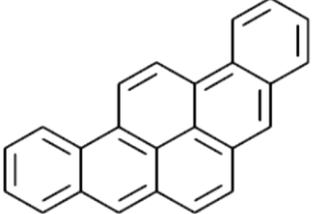
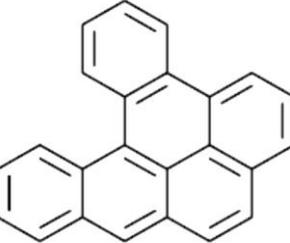
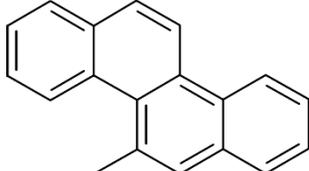
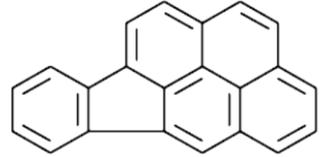
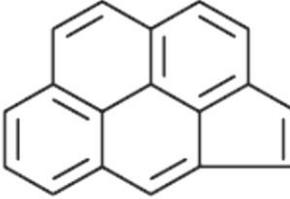
Продукты детского питания не более 1 мкг\кг по сумме 4 ПАУ.

ISO 15753:2006 Animal and vegetable fats and oils - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons

ISO 15302:2007 Animal and vegetable fats and oils - Determination of benzo[a]pyrene - Reverse-phase high performance liquid chromatography method

ISO 22959:2009 Animal and vegetable fats and oils - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line donor-acceptor complex chromatography and HPLC with fluorescence detection

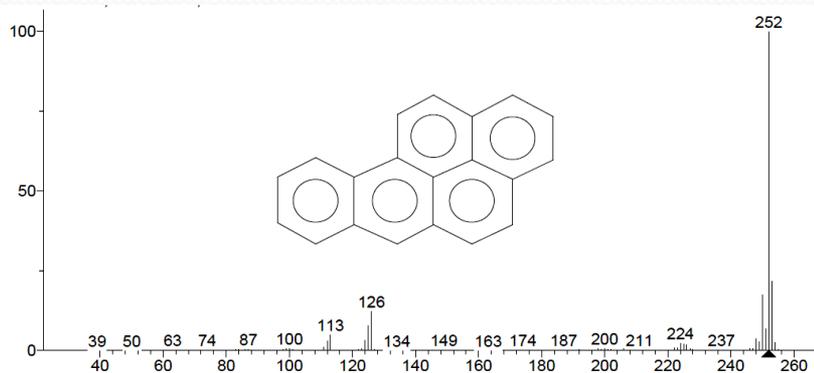
Приоритетные полиароматические углеводороды

				
Бенз[<i>a</i>]антрацен	Бенз[<i>b</i>]флуорантен	Бенз[<i>j</i>]флуорантен	Бенз[<i>k</i>]флуорантен	Бенз[<i>ghi</i>]перилен
				
Бенз[<i>a</i>]пирен	Хризен	Дибенз[<i>a,h</i>]пирен	Дибенз[<i>a,h</i>]антрацен	Дибенз[<i>a,e</i>]пирен
				
Дибенз[<i>a,i</i>]пирен	Дибензо[<i>a,l</i>]пирен	5-метилхризен	Инден[1,2,3- <i>cd</i>]пирен	Циклопента[<i>c,d</i>]пирен

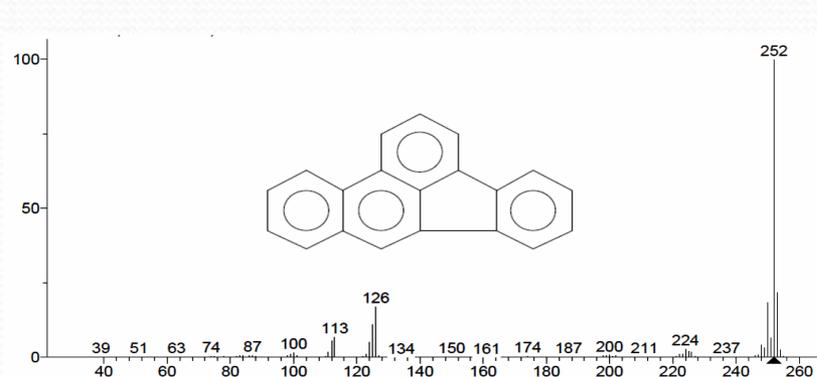
15 ПАУ, которые, по мнению Научного Комитета ЕС по безопасности продуктов питания (Scientific Committee on Food, SCF), проявляют явные канцерогенные и мутагенные эффекты в различных типах биопроб подопытных животных.

Масс-спектры бенз(а)пирена, бенз(в)флуорантрена, бенз(к)флуорантрена (ГХ-МС с ионизацией электронным ударом).

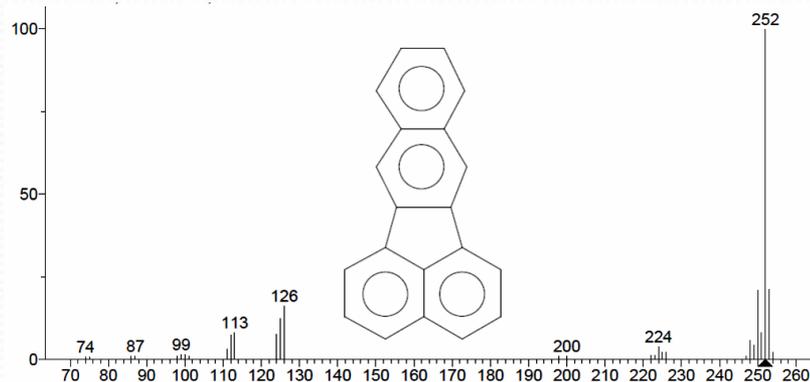
Бенз(а)пирен



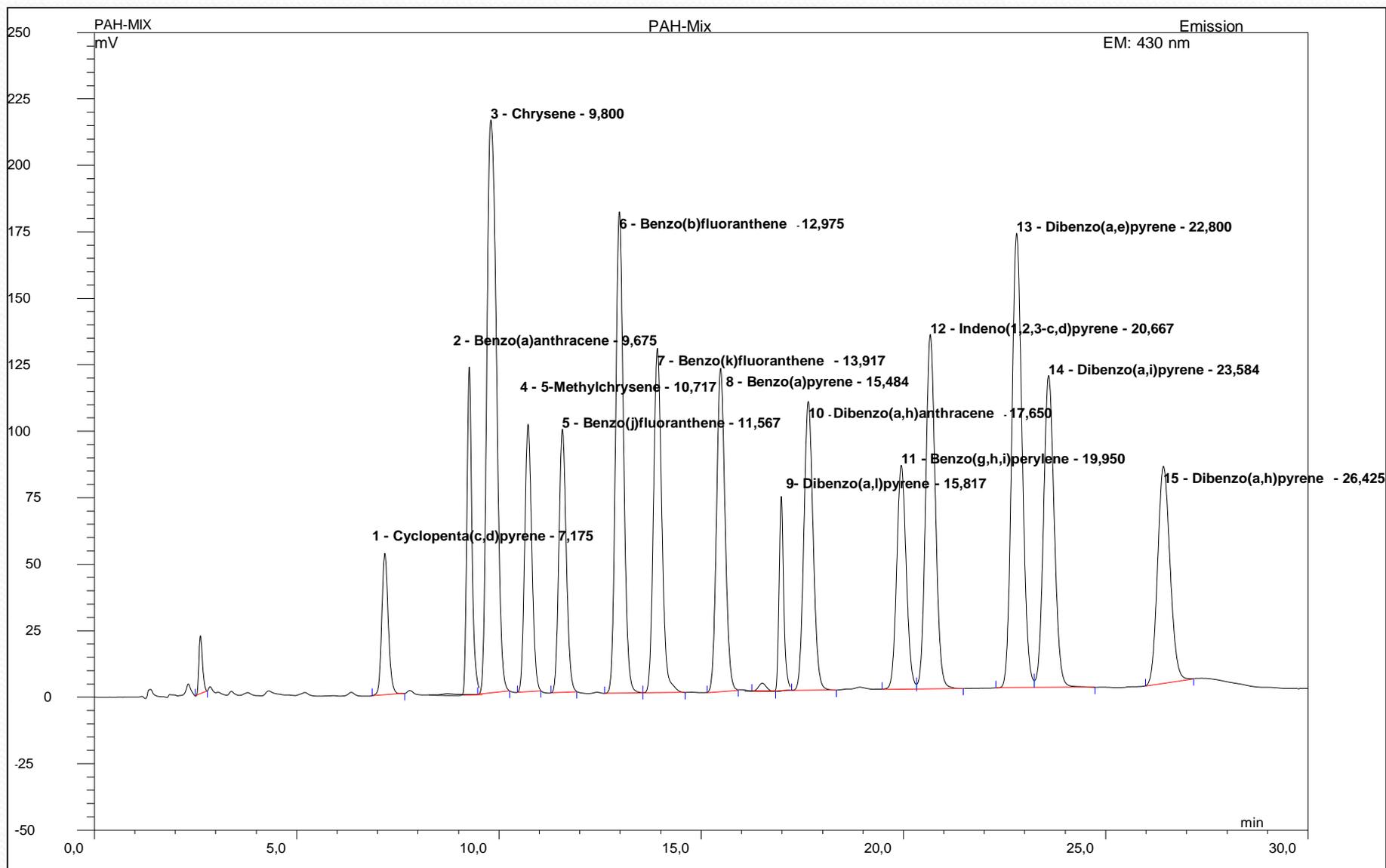
Бенз(в)флуорантрен



Бенз(к)флуорантрен



Хроматограмма разделения калибровочной смеси 15 ПАУ



Определение остаточных количеств антибиотиков в продуктах животного происхождения

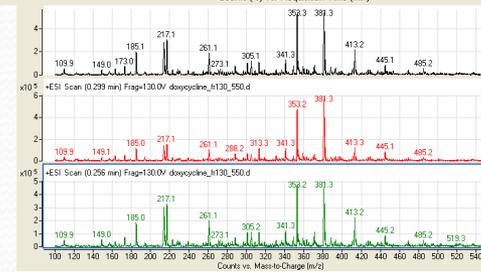
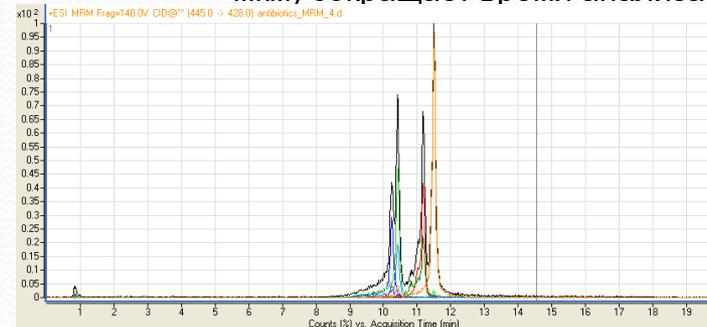
Преимущества ВЭЖХ с трехквадрупольным (QQQ) масс-детектором Agilent 6410

- режим селективного ионного детектирования (SIM) исключает возможность ложноположительных результатов, в случае присутствия в пробах веществ, дающих перекрестные сигналы
- режим мониторинга дочерних ионов (MRM) дает возможность качественной идентификации искомого соединения при совпадении их молекулярных масс, например тетрациклин и доксициклин (444.435)
- в режиме ионизации электроспрей (ESI) с детектированием отрицательно заряженных ионов нижний предел обнаружения составляет 0.2 ppb для левомицетина (соответствует нормам ТР ТС 021/2011) с детектированием положительно заряженных ионов нижний предел обнаружения составляет 0.01 ppm для тетрациклиновой группы (соответствует нормам ТР ТС 021/2011)



Применение твердофазной экстракции (ТФЭ) при пробоподготовке позволяет избавиться от посторонних органических примесей

Использование хроматографических колонок с мелкозернистым сорбентом (1,8 мкм) сокращает время анализа



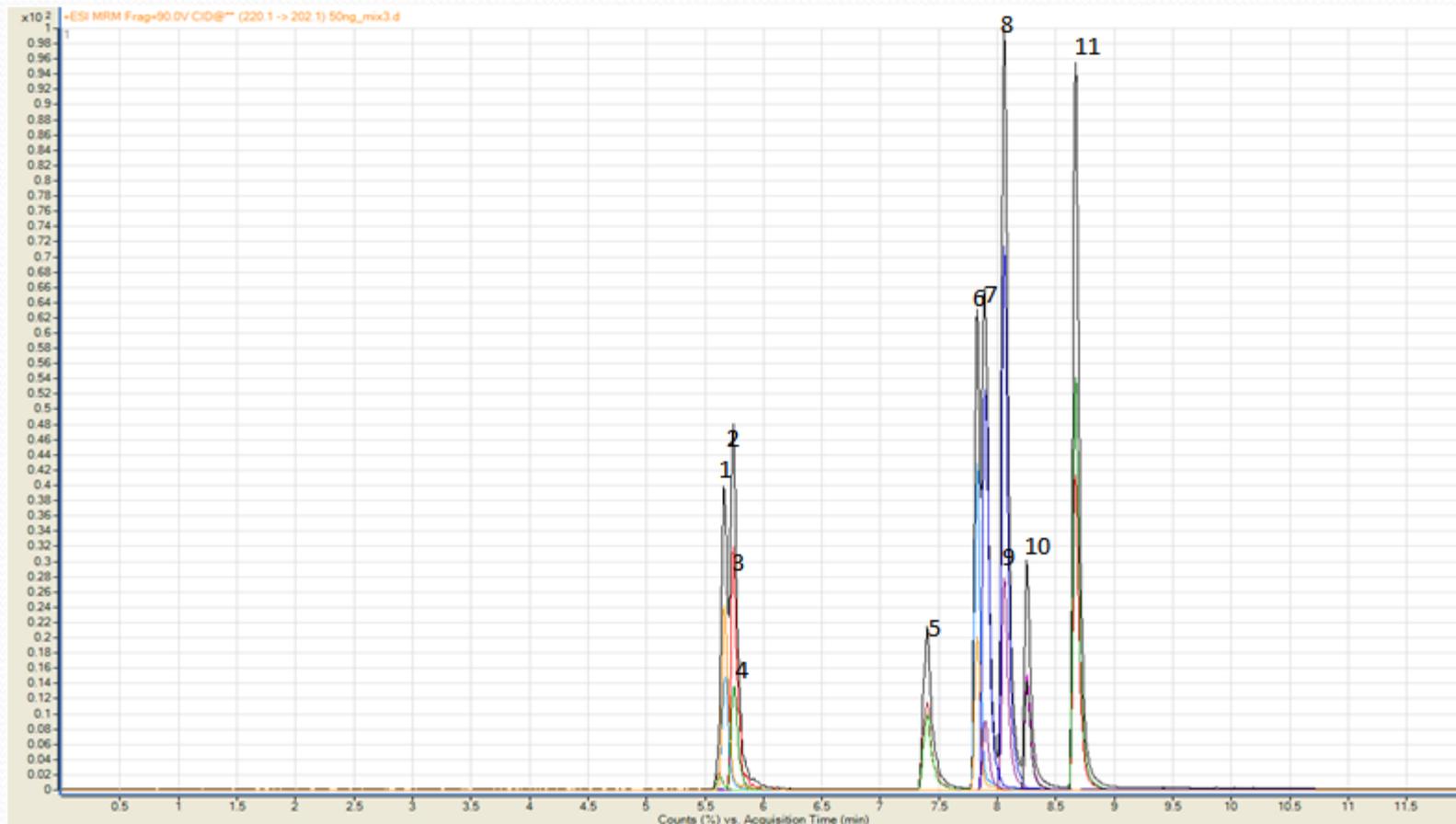
Параметры воздействия на ионы в режиме MRM и условия ионизации распылением в электрическом поле (ESI) с регистрацией положительных и отрицательных ионов

Аналит	Молекулярный ион, m/z	Дочерние ионы, m/z	Напряжение на фрагменторе (Frag), В	Энергия диссоциации (CE), В	Полярность																												
Сl-тетрациклин	479	462	140	15	+																												
		444		20		Окситетрациклин	461	443	90	15	+	426	15	Доксициклин	445	428	140	15	+	147	30	Тетрациклин	445	427	140	10	+	410	15	Левомецитин	332	258	130
Окситетрациклин	461	443	90	15	+																												
		426		15		Доксициклин	445	428	140	15	+	147	30	Тетрациклин	445	427	140	10	+	410	15	Левомецитин	332	258	130	20	-	195	10				
Доксициклин	445	428	140	15	+																												
		147		30		Тетрациклин	445	427	140	10	+	410	15	Левомецитин	332	258	130	20	-	195	10												
Тетрациклин	445	427	140	10	+																												
		410		15		Левомецитин	332	258	130	20	-	195	10																				
Левомецитин	332	258	130	20	-																												
		195		10																													

Идентификация бета-адреностимуляторов методом ВЭЖХ-МС



Идентификация бета-адреностимуляторов методом ВЭЖХ-МС с ионизацией ESI



1- кленбутерол; 2-сальбутамол; 3- рактопамин; 4- тербуталин; 5-сальметерол; 6- пропранолол; 7-тулобутерол; 8-циматерол; 9-мабутерол; 10-мапентерол; 11- зилпатерол

Идентификация бета-адреностимуляторов методом ВЭЖХ-МС с ионизацией ESI

Параметры воздействия на ионы в режиме MRM и условия ионизации распылением в электрическом поле (ESI) с регистрацией положительных ионов

Аналит	Молекулярный ион, m/z	Дочерние ионы, m/z	Напряжение на фрагменторе (Frag), В	Энергия диссоциации (CE), В
Кленбутерол	277,2	203,1 259,1	100	12 5
Сальбутамол	240,2	148,2 222,1	100	15 5
Рактопамин	302,2	164,2 284,1	110	12 6
Тербуталин	226,1	152,2 170,2	100	12 6
Сальметерол	416,3	380,3 398,4	130	17 10
Пропранолол	260,2	116,2 183,2	120	15 15
Тулобутерол	228,1	154,1 172,2	100	12 5
Циматерол	220,1	160,2 202,1	90	12 3
Мабутерол	311,2	237,1 293,2	110	13 7
Мапентерол	325,3	237,1 307,2	110	12 5
Зилпатерол	262,2	244,2 202,2	100	7 17

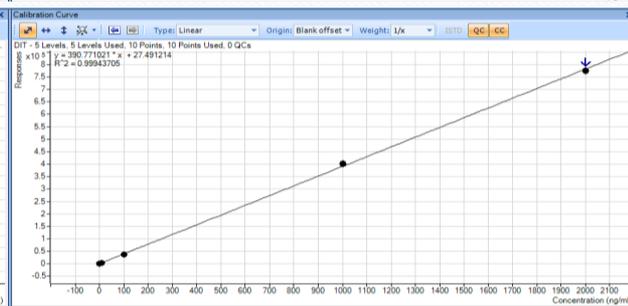
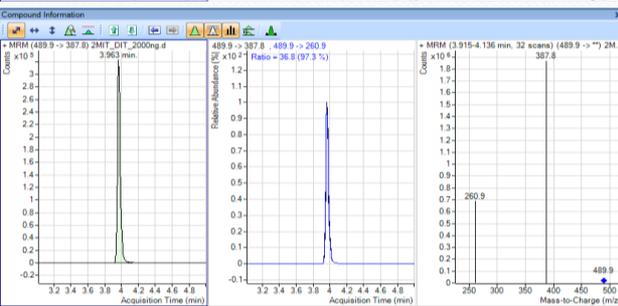
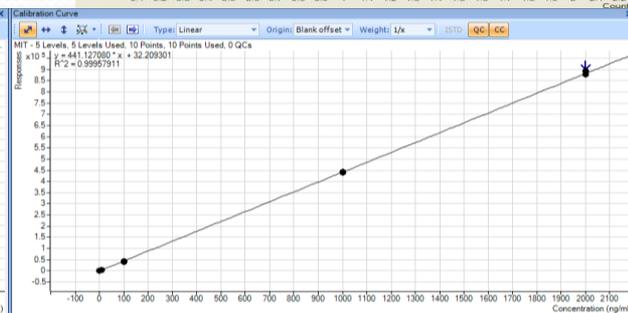
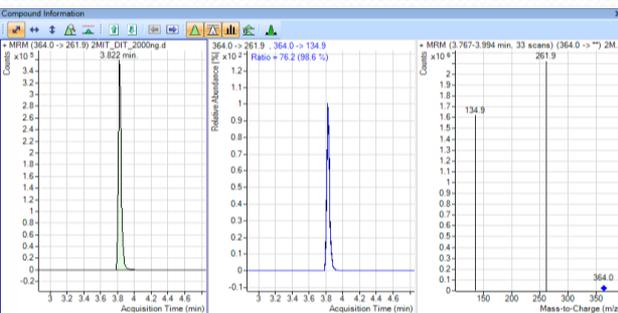
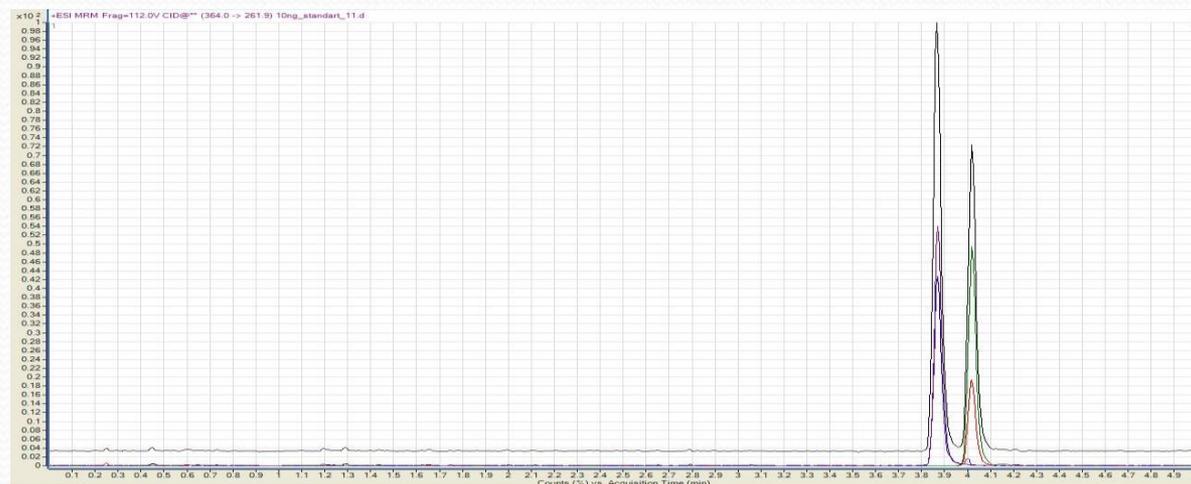
Диапазон измерений бета-агонистов составляет от 0,1 до 100 мкг/кг. Измерение массовой доли бета-агонистов основано на ферментативном гидролизе пробы пищевого продукта, извлечении целевых веществ смесью изопропилового спирта с этилацетатом и очистке пробы методом твердофазной экстракции (ТФЭ), и последующем ВЭЖХ-МС/МС анализе.

ГОСТ 33607–2015 Мясо и мясные продукты.
Определение бета-агонистов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Определение йодтирозинов методом ВЭЖХ-МС/МС с ESI

Хроматограмма градуировочных растворов йодтирозинов (общий ионный ток и MRM переходы МИТ и ДИТ)

Калибровочные кривые градуировочных растворов йодтирозинов в диапазоне концентраций 1,0-2000,0 нг/см³



МИ 103.5-132-2012 Определение содержания йодтирозинов в йодированных молочных белках и БАДах на их основе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

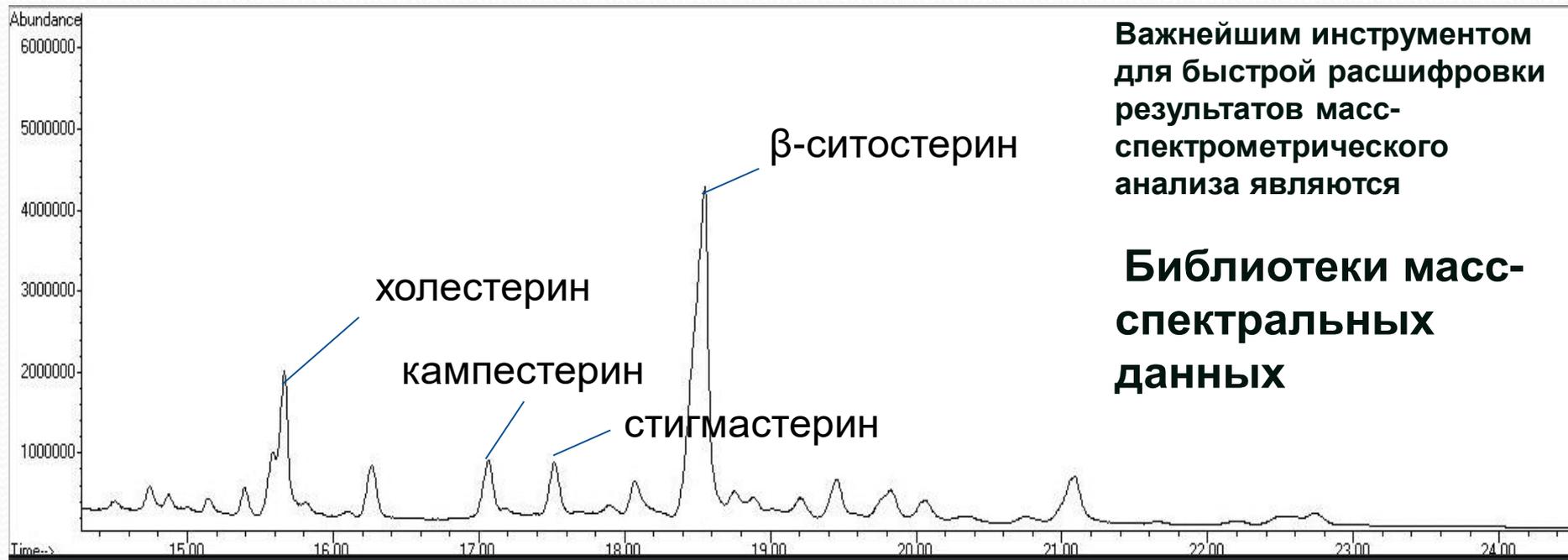
ГОСТ 33422-2015 Мясо и мясные продукты. Определение массовой доли йодтирозинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Масс-спектрометр Agilent Technologies 5975 С



- **ГОСТ 33608-2015** Мясо и мясные продукты . Идентификация немясных ингредиентов растительного происхождения с помощью метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором
- **ГОСТ Р 55483-2013** Мясо и мясные продукты. Определение жирно-кислотного состава методом газовой хроматографии

Хроматограмма образца с присутствием фитостерина



Важнейшим инструментом для быстрой расшифровки результатов масс-спектрометрического анализа являются

Библиотеки масс-спектральных данных

Наименование	Характеристические ионы, а.е.м.	
	целевой	подтверждающие
Холестерин	386	275; 301
Брассикастерин	398	255; 300
Кампестерин	400	43; 81
Стигмастерин	412	55; 83
β-ситостерин	414	329; 145

Разработанные методики и ГОСТы

- **МИ 103.5-132-2012** Определение содержания йодтирозинов в йодированных молочных белках и БАДах на их основе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
- **МИ 1035-135-2012** Определение содержания лимонной и молочной кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в мясном сырье, мясных и мясосодержащих продуктах
- **ГОСТ 32307–2013** Мясо и мясные продукты. Определение содержания жирорастворимых витаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.
- **ГОСТ Р 55482-2013** Мясо и мясные продукты. Метод определения содержания водорастворимых витаминов.
- **ГОСТ 32308-2013** Мясо и мясные продукты. Определение содержания хлорорганических пестицидов методом газожидкостной хроматографии
- **ГОСТ Р 55483-2013** Мясо и мясные продукты. Определение жирно-кислотного состава методом газовой хроматографии
- **ГОСТ 33607–2015** Мясо и мясные продукты . Определение бета-агонистов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором
- **ГОСТ 33422–2015** Мясо и мясные продукты . Определение массовой доли йодтирозинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором
- **ГОСТ 33429–2015** Мясо и мясные продукты . Определение содержания молочной кислоты и лактатов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
- **ГОСТ 33608-2015** Мясо и мясные продукты . Идентификация немясных ингредиентов растительного происхождения с помощью метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Разработанные методики и ГОСТы

- **ГОСТ 33809-2016** Мясо и мясные продукты. Определение сорбиновой и бензойной кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
- **ГОСТ 33819-2016** Мясо и мясные продукты. Определение состава летучих жирных кислот методом газовой хроматографии
- **ГОСТ 33934-2016** Мясо и мясные продукты. Определение цинкбацитрацина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором
- **ГОСТ 33808-2016** Мясо и мясные продукты. Определение лимонной кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
- **ГОСТ 34131-2017** Мясо и мясные продукты. Метод обнаружения облученных продуктов газовой хроматографией
- **ГОСТ 34133-2017** Мясо и мясные продукты. Метод определения аскорбиновой кислоты и аскорбатов высокоэффективной жидкостной хроматографией
- **ГОСТ 34132-2017** Мясо и мясные продукты. Метод определения аминокислотного состава животного белка
- **ГОСТ 34134 -2017** Мясо и мясные продукты. Метод определения состава свободных углеводов
- **ГОСТ 34119-2017** Мясо и мясные продукты. Метод определения полициклических ароматических углеводородов высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектором
- **ГОСТ 34480-2018** Мясо и мясные продукты. Определение амфениколов и пенициллинов методом тандемной жидкостной масс-спектрометрии

- 1. Kulikovskii A. V. Determination of Iodotyrosines in Food / A. V. Kulikovskii, A. B. Lisitsyn, I. M. Chernukha, I. F. Gorlov, and S. A. Savchuk // Journal of Analytical Chemistry. - 2016. - V. 71. - №12. - P.1215–1219. (Scopus, JCR: 0,694) DOI: 10.1134/S1061934816100087
- 2. Kulikovskii A. V. Determination of Growth Hormones (β -Agonists) in Muscle Tissue by HPLC with Mass Spectrometric Detection / A. V. Kulikovskii, A. B. Lisitsyn, I. F. Gorlov, M. I. Slozhenkina, and S. A. Savchuk // Journal of Analytical Chemistry. - 2016. - V. 71. - №10. - P. 1052–1056. (Scopus, Web of Science, JCR: 0,694) DOI: 10.1134/S1061934816100075
- 3. Куликовский А.В. Методические аспекты определения органического йода (йодтирозинов) в пищевых продуктах / А.В. Куликовский, А.Б. Лисицын, О.А. Кузнецова, Н.Л. Вострикова, И.Ф. Горлов // Вопросы питания. - 2016. - Т. 85. - № 4. - С. 110-116 (Scopus, JCR: 0,509)
- 4. Куликовский А. В. Комплексная оценка содержания полициклических ароматических углеводородов и особенности их накопления в мясной продукции / А. В. Куликовский, И. Ф. Горлов, М.И. Сложенкина, А.Н. Иванкин, Н.Л. Вострикова, О.А. Кузнецова // Вопросы питания. 2017. Т. 86. № 6. С. 125-133. (Scopus, JCR: 0,509)
- 5. Kulikovskii A.V. Methodology of the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods/ Kulikovskii A.V., Vostrikova N.L., Chernukha I.M., Savtchuk S.A. // Journal of Analytical Chemistry.- 2014.- V.69.- №2.- P. 205–209. (Scopus, Web of Science, JCR: 0,694) DOI: 10.1134/S1061934813120058
- 6. Ivankin A. N. Determination of Unsaturated Fatty Acids with a Migrating Double Bond in Complex Biological Matrices by Gas Chromatography with Flame Ionization and Mass Spectrometry Detection / A. N. Ivankin, G. L. Oliferenko, A. V. Kulikovskii, I. M. Chernukha, A. A. Semenova, K. I. Spiridonov, and V. V. Nasonova // Journal of Analytical Chemistry. - 2016. - V. 71. - №11. - P. 1131–1137. (Scopus, Web of Science, JCR: 0,694) DOI: 10.1134/S1061934816100075
- 7. N.L. Vostrikova Study and identification of main proteins and peptides to determine the content of muscle protein in structureless cooked products by the method of two-dimensional electrophoresis followed by the time-of-flight mass spectrometry identification / N.L. Vostrikova, I. M. Chernukha, A.V. Kulikovskiy, and S.S. Shishkin // Foods and Raw Materials. - 2016. V. 4, № 2. - P. 136 – 147 DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-136-147
- 8. A. N. Ivankin Cis and Trans Conformational Changes of Bacterial Fatty Acids in Comparison with Analogs of Animal and Vegetable Origin / A. N. Ivankin, A. V. Kulikovskii, N. L. Vostrikova, and I. M. Chernuha // Applied Biochemistry and Microbiology. - 2014. - V. 50. -№ 6. - P. 668–674. (Scopus, JCR: 0,689) DOI: 10.1134/S0003683814060052
- 9. N. L. Vostrikova Determination of Muscular Tissue Proteins by 2D Electrophoresis and Time-of-Flight Mass Spectrometry / N. L. Vostrikova, A. V. Kulikovskii, I. M. Chernukha, L. I. Kovalev, S. A. Savchuk // Journal of Analytical Chemistry. - 2017. - Vol. 72. - № 10. P. 1102–1112. (Scopus, Web of Science, JCR: 0,694) DOI: 10.1134/S1061934817100173



Ваши вопросы?