

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии
и безопасности пищи

На правах рукописи

МАКАРЕНКО МАРИЯ АНДРЕЕВНА

**ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ И
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ КОНТАМИНАНТОВ НЕКОТОРЫХ ПИЩЕВЫХ МАСЕЛ,
ЖИРОВ И МАСЛОЖИРОВЫХ ПРОДУКТОВ**

3.2.1 Гигиена

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Бессонов В.В.

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность темы.....	6
Цель исследования.....	9
Задачи исследования.....	9
Положения, выносимые на защиту.....	10
Научная новизна.....	10
Практическая значимость и внедрение результатов исследования.....	11
Соответствие диссертации плану научной специальности.....	13
Апробация работы.....	13
Публикации.....	13
Личный вклад соискателя.....	13
Объём и структура диссертации.....	14
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Характеристика продуктов окисления масел и жиров и технологических контаминантов сложных эфиров МХПД и глицидола	15
1.1.1. Продукты окисления пищевых масел и жиров.....	15
1.1.2. Сложные эфиры МХПД и глицидола.....	22
1.2. Токсикологическая характеристика	24
1.2.1. Токсикологическая характеристика продуктов окисления масел и жиров.....	24
1.2.2. 2-МХПД, 3-МХПД, глицидол и их эфиры с жирными кислотами.....	34
1.3. Нормативное регулирование	37
1.3.1. Нормативное регулирование первичных и вторичных продуктов окисления растительных масел и животных жиров.....	37
1.3.2. Нормативное регулирование содержания 3-МХПД и глицидола.....	40
1.4. Методы исследований	42
1.4.1. Изучение окислительной деградации пищевых растительных масел.....	42
1.4.2. Определение сложных эфиров МХПД и глицидола.....	57
ВЫВОДЫ	63
Выбор методик оценки окислительной деградации пищевых растительных масел.....	63
Выбор методики анализа эфиров монохлорпропандиолов и глицидиловых эфиров в пищевых маслах и жирах.....	63
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	65
2.1 Объекты исследования	65
2.1.1 Масла, жиры и масложировые продукты.....	65

2.1.2	Условия форсированного окисления подсолнечных масел (подготовительный эксперимент).....	66
2.1.3	Условия нефорсированного окисления подсолнечных масел (основной эксперимент).....	67
2.2	Характеристика оборудования.....	68
2.2.1	Изучение процессов окисления подсолнечного масла.....	68
2.2.2	Определение содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола.....	69
2.3	Характеристика аналитических стандартов и реактивов.....	69
2.3.1	Изучение процессов окисления подсолнечного масла.....	69
2.3.2	Определение содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола.....	70
2.4	Изучение процессов окисления подсолнечных масел и технологических контаминантов.....	71
2.4.1	Определение жирнокислотного состава.....	71
2.4.2	Определение перекисного числа.....	72
2.4.3	Определение анизидинового числа.....	72
2.4.4	Изучение динамики окисления методом ИК-спектроскопии.....	73
2.4.5	Определение летучих веществ масел методом ТФМЭ с ГХ/МС.....	73
2.4.6	Определение содержания технологических контаминантов эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в пищевых маслах.....	78
2.5	Методы статистической обработки экспериментальных данных.....	85
2.6	Схема исследования.....	85
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ОКИСЛЕНИЯ ПОДСОЛНЕЧНЫХ МАСЕЛ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ОЧИСТКИ.....		87
3.1	Изменение жирнокислотного состава подсолнечных масел в процессе многократной очистки и при хранении.....	87
3.2	Изменение перекисного числа подсолнечных масел в процессе многократной очистки и при хранении.....	91
3.3	Изменение анизидинового числа подсолнечных масел в процессе многократной очистки и при хранении.....	93
3.4	Исследование процессов окисления подсолнечных масел методом ИК-спектроскопии.....	94
3.5	Изучение летучих веществ масел методом ТФМЭ с ГХ/МС. Оптимизация условий экстракции.....	103
3.5.1	Подбор волокна для твердофазной микроэкстракции летучих веществ.....	103
3.5.2	Оптимизация параметров экстракции летучих веществ.....	113

3.6	Характеристика летучих веществ подсолнечных масел разной очистки методом ТФМЭ с ГХ-МС/ПИД.....	120
3.7	Изменение летучих веществ подсолнечных масел разной очистки при хранении	129
3.8	Изменение состава подсолнечных масел разной степени очистки в процессе длительного хранения при -25° С.....	135
3.8.1	Изменение ИК-спектров подсолнечных масел при хранении в морозильной камере	135
3.8.2	Изменение перекисного числа подсолнечных масел при хранении в морозильной камере.....	136
3.8.3	Изменение профиля летучих веществ подсолнечных масел при хранении в морозильной камере.....	137
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	143
	ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭФИРОВ 3-МХПД, 2-МХПД, ЭФИРОВ ГЛИЦИДОЛА В ПИЩЕВЫХ МАСЛАХ И ЖИРАХ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И СПОСОБА ОБРАБОТКИ.....	145
4.1	Оптимизация и метрологическая оценка методики определения эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и эфиров глицидола методом длительной щелочной переэтерификации с ГХ/МС-МС.....	145
4.1.1	Подбор параметров MRM-режима работы детектора	146
4.1.2	Построение градуировочных прямых	148
4.1.3	Расчёт содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидиловых эфиров	149
4.1.4	Анализ контрольной пробы	150
4.1.5	Оценка метрологических характеристик разработанной методики	151
4.2	Исследование содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в различных пищевых маслах и жирах.....	152
4.2.1	Содержание 3-МХПДЭ в маслах, жирах и маложировых продуктах различного происхождения и способа обработки.	157
4.2.2	Содержание 2-МХПД в маслах, жирах и маложировых продуктах различного происхождения и способа обработки.	159
4.2.3	Содержание глицидола в в маслах, жирах и маложировых продуктах различного происхождения и способа обработки.	161
4.3	Исследование зависимостей содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола от степени очистки подсолнечного масла	163
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	166

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	167
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	169
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	170
ЛИТЕРАТУРА	172
ПРИЛОЖЕНИЯ	202
Приложение А. Заключение о соответствии методики измерений установленным метрологическим характеристикам.	202
Приложение Б. Свидетельство о метрологической аттестации методики определения содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и животных жирах методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС).	204
Приложение В. Отчёт по метрологической оценке методики определения содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и животных жирах методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС).	206
Приложение Г. ИК-спектры подсолнечных масел.	229

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Пищевые растительные масла и жиры являются одним из основных источников энергии в питании человека. Они придают пище приятную текстуру, являются носителями вкуса и аромата [17] а также служат субстратом для доставки в организм биологически активных веществ, в частности таких как ненасыщенные жирные кислоты, жирорастворимые витамины и провитамины, фосфатиды [20]. Однокомпонентные растительные масла и жиры служат для производства составных масложировых и маслосодержащих продуктов с заданными свойствами и составом – заменителей других растительных дорогостоящих масел (например, какао), жиров специального назначения (шортенингов), маргаринов и других. Такие продукты могут использоваться как ингредиенты для пищевой промышленности (хлебопекарной, кондитерской и проч.), так и в качестве самостоятельных продуктов (маргарины).

В технологии производства пищевых растительных масел и жиров используются последовательные циклы их нагрева/охлаждения, а также удаления из них различных групп веществ, которые могут являться естественными антиоксидантами (воски, фосфолипиды, токоферолы, витамины и др.) [1]. Полный цикл рафинации и дезодорации практически полностью избавляет свежие масла также от продуктов перекисного окисления, свободных жирных кислот, спиртов и других летучих продуктов окисления и летучих веществ. Это приводит к снижению нормируемых показателей окисленности перекисного и кислотного чисел и устранению характерных вкуса и аромата (рис.1).

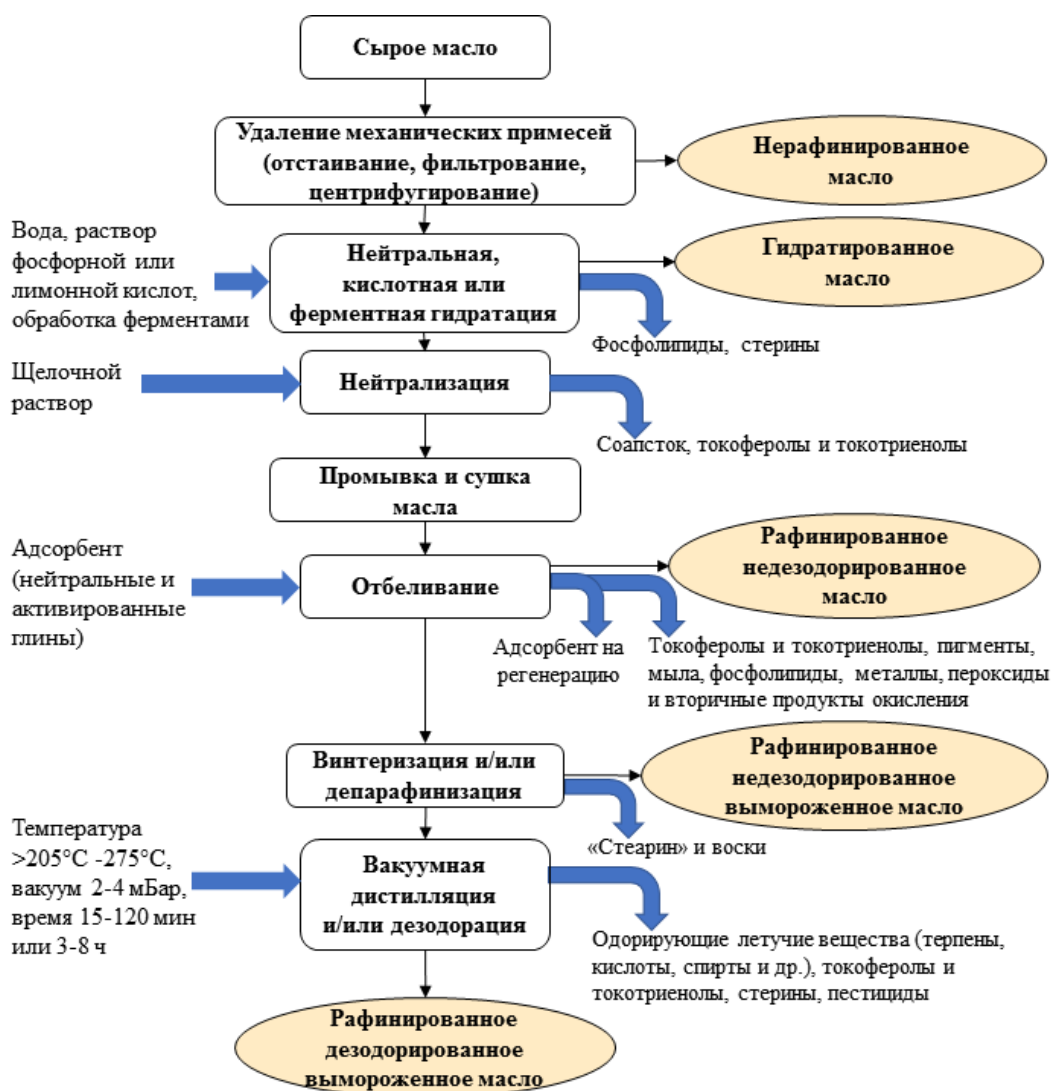


Рис. 1 Одна из возможных технологических схем избавления от примесей (рафинация) для получения растительных масел различной степени очистки.

Для реализации на российском рынке масложировая продукция должна соответствовать показателям качества и безопасности, установленным в Технических регламентах Таможенного союза ТР ТС 024/2011 «Технический регламент на масложировую продукцию»¹ (далее ТР ТС 024/2011) и ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»² (далее ТР ТС 021/2011). Обеспечение требований регламентов в случаях использования масел после длительного хранения или транспортировки, например из региона выращивания с иным климатом, может реализовываться производителями в том числе путём применения повторных циклов рафинации и/или дезодорации. Основная цель этого процесса - снижение показателей окислительной порчи, таких как кислотное и перекисное числа, до приемлемых значений. В некоторых случаях, например при производстве масложировых смесей, количество таких очисток может

¹ Технический регламент Таможенного союза «Технический регламент на масложировую продукцию» ТР ТС 024/2011 (с изменениями на 23 апреля 2015 года). – 37 с.

² Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» ТР ТС 021/2011 с изменениями на 8 августа 2019 года. - 242 с.

достигать трёх и более: после производства ингредиентных масел, после доставки в регион переработки и после переэтерификации. Такая глубокая очистка может привести к значительному снижению устойчивости таких масел к окислению. Например, в этих условиях ненасыщенные жирные кислоты растительных и животных, особенно содержащие *цис*-двойные связи, подвержены изомеризации и образованию новых соединений, часть из которых могут представлять опасность для здоровья человека. Такими соединениями могут быть транс-изомеры жирных кислот [242], некоторые альдегиды [116], токсины (лейко-, изолейкотоксины) [193].

В настоящее время основными показателями безопасности пищевых масел и жиров при производственном контроле и контроле/надзоре в обороте, по которым осуществляется нормирование окислительных процессов, являются перекисное, кислотное и в некоторых случаях анизидиновое числа. Считается, что перекисное число отражает содержание первичных продуктов окисления различной природы, его определение проводят наиболее часто. Кислотное число измеряет содержание свободных жирных кислот, присутствующих нативно в прессовых маслах и образующихся под действием липаз или при гидролизе ацилглицеридов в очищенных маслах. Анизидиновое число показывает содержание вторичных продуктов окисления, а именно альдегидов и кетонов, главным образом ненасыщенных. Его измерение проводят на более поздних этапах окисления ввиду его недостаточной чувствительности к низким содержаниям вторичных продуктов окисления.

Количественное определение первичных продуктов окисления – перекисное число – служит прямым индексом статуса окисленности пищевых растительных масел и жиров. Однако этот метод не может дать чётких данных по содержанию перекисей в жировых продуктах по ряду причин. К ним относятся: зависимость результатов от условий проведения производства и анализа, методов извлечения жира (при анализе пищевых продуктов), присутствия антиоксидантов, прооксидантов, катионов металлов и других реакционных соединений, а также от квалификации оператора [83, 296]. Кроме того, сами первичные продукты окисления не являются устойчивыми соединениями и разлагаются до вторичных продуктов окисления со скоростью, превышающей образование самих пероксидов.

Помимо прочего, условия проведения рафинации и высокие температуры дезодорации могут способствовать образованию новых нежелательных веществ, концентрация которых в маслах также может увеличиваться или снижаться с увеличением количества повторных очисток. К таким веществам относятся, в том числе, сложные эфиры 3-монохлорпропан-1,2-диола с жирными кислотами (3-МХПДЭ), 2-

монохлорпропан-1,3-диола с жирными кислотами (2-МХПДЭ) и сложные глицидиловые эфиры с жирными кислотами (ГЭ) [99]. Некоторые из этих веществ отнесены к возможным канцерогенам человека [27]. На сегодняшний день в странах Таможенного союза, в т.ч. в Российской Федерации, действует норматив по содержанию глицидиловых эфиров в растительных маслах не для производства детского питания в пересчете на глицидол не более 1,0 мг/кг [10]. Также, в Европейском Союзе с 23 сентября 2020 года действует норматив по содержанию эфиров 3-МХПД и пересчёте на свободный 3-МХПД 1,25 мг/кг [72].

На момент подготовки и написания настоящей работы в литературе не были обнаружены систематизированные исследования по содержанию индивидуальных продуктов первичного и вторичного окисления липидов в пищевых маслах и жирах различной степени обработки. Кроме того, в Российской Федерации отсутствовала официально утвержденная и аттестованная методика определения 3-МХПДЭ, 2-МХПДЭ и ГЭ в пищевых растительных маслах и жирах; отсутствовали исследования по содержанию данных соединений в пищевых маслах, представленных на российском рынке. Таким образом существует необходимость в разработке новых подходов, позволяющих проводить оценку начальных этапов окислительного статуса, в том числе определять индивидуальные вторичные продукты окисления липидов, а также осуществлять лабораторный контроль содержания технологических контаминантов эфиров монохлорпропандиолов и глицидиловых эфиров в пищевых растительных маслах и жирах различной степени обработки.

Цель исследования

Целью настоящей работы было определить влияние степени переработки пищевого масла на его устойчивость к окислению, формирование вторичных продуктов окисления и технологических контаминантов сложных эфиров монохлорпропандиолов и глицидола с жирными кислотами.

Задачи исследования

1. Определить способ и оптимальные условия анализа летучих веществ подсолнечного масла разной степени очистки.
2. Оценить устойчивость подсолнечных масел к окислению в зависимости от степени очистки. Идентифицировать индивидуальные летучие вещества и вторичные продукты окисления подсолнечных масел разной степени очистки. Оценить преобладающие индивидуальные летучие соединения по степени опасности для здоровья человека.

3. Разработать и метрологически аттестовать метод определения сложных эфиров монохлорпропандиолов и глицидола с жирными кислотами в пищевых маслах и жирах.

4. Оценить влияние степени очистки подсолнечных масел на образование сложных эфиров монохлорпропандиолов и глицидола с жирными кислотами. Изучить содержание сложных эфиров монохлорпропандиолов и глицидола с жирными кислотами в различных пищевых маслах, жирах и масложировых продуктах, представленных на Российском рынке.

Положения, выносимые на защиту

1. Проведение дополнительных дезодораций (более одной дезодорации) может снижать окислительную устойчивость пищевых масел, повышать содержание в них вредных для здоровья человека соединений, таких как транс-изомеры жирных кислот, ненасыщенные альдегиды и эфиры монохлорпропандиолов.

2. Технология изготовления составных масложировых продуктов обуславливает высокий уровень контаминации МХПДЭ и ГЭ. Для обеспечения безопасности таких видов продукции необходима оптимизация технологических процессов, а именно снижение температур обработки до уровней, которые обеспечивают приемлемую эффективность работы оборудования с достижением предлагаемого норматива по содержанию глицидиловых эфиров в пересчете на глицидол (не более 1 мг/кг масла).

3. Метод твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) с ГХ-МС/ПИД является перспективным инструментом для регистрации и идентификации летучих веществ, характеризующих аромат пищевых масел и жиров. Одним из основных составляющих этого аромата являются летучие вторичные продукты окисления.

4. Идентификация и измерение летучих вторичных продуктов окисления могут быть использованы для оценки контаминации вторичных продуктов окисления на ранних этапах окислительной порчи пищевых масел и жиров.

Научная новизна

Впервые:

- проведена комплексная оценка изменения химического состава пищевых подсолнечных масел в зависимости от степени переработки в условиях традиционных технологий производства масложировых продуктов: исследованы жирнокислотный состав масел, содержание первичных и вторичных продуктов окисления, профиль летучих веществ, включая летучие вторичные продукты окисления, определены уровни

технологических контаминантов - эфиров монохлорпропандиолов (3-МХПД, 2-МХПД) и глицидиловых эфиров.

- получены данные, свидетельствующие о негативном влиянии повторных дезодораций на содержание вредных для здоровья человека веществ - транс-изомеров жирных кислот, ненасыщенных альдегидов и эфиров МХПД, а также на образование потенциально канцерогенных летучих веществ, например 1,2-эпоксибутана

- показана взаимосвязь условий хранения масложировой продукции разной степени очистки (температуры, влажности, освещения и аэрации, близких к нормальным, и длительности хранения) и уровней содержания в ней летучих вторичных продуктов окислительной порчи и технологических контаминантов.

- впервые в Российской Федерации проведены исследования содержания технологических контаминантов (эфиров МХПД и глицидиловых эфиров) в пищевых растительных маслах, жирах и масложировых продуктах, представленных на отечественном рынке.

- подтвержден факт, что наличие рафинированных дезодорированных масел в составных масложировых продуктах коррелирует с повышенными уровнями эфиров МХПД и глицидиловых эфиров.

Практическая значимость и внедрение результатов исследования

1. Разработаны Методические указания МУК 4.1.3547-19 «Определение содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и животных жирах». Они позволяют проводить определение содержания этих технологических контаминантов методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС/МС). Диапазон определяемых концентраций методики позволяет использовать ее для обеспечения единых санитарных требований для масел растительных в части контроля содержания глицидиловых эфиров жирных кислот в пересчете на глицидол (Решение №132 от 06.08.2019 [10]). Методика также может быть использована для обеспечения нормативов по содержанию эфиров 3-монохлорпропандиола в масложировой продукции, если таковые будут введены на территории Российской Федерации [72].

Разработанные Методические указания являются основной рабочей методикой определения 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в лаборатории химии пищевых продуктов ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». МУК 4.1.3547-19 также внедрены в работу и применяются ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, лабораториями Роспотребнадзора, выполняющих исследования в рамках Национального

проекта «Демография» для определения вышеуказанных контаминантов в масложировой продукции. МУК 4.1.3547-19 включен в перечень исследований:

- Методических рекомендаций МР 2.3.7.0168-20 Оценка качества пищевой продукции и оценка доступа населения к отечественной пищевой продукции, способствующей устранению дефицита макро- и микронутриентов. Методические рекомендации утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 20.03.2020;

- Методических рекомендаций МР 2.3.7.0271-22 Изменения №2 в МР 2.3.7.0168-20 Оценка качества пищевой продукции и оценка доступа населения к отечественной пищевой продукции, способствующей устранению дефицита макро- и микронутриентов.

2. Научно обоснованы предложения по корректировке требования об обязательной обработке масел растительных после транспортировки наливом («как минимум проведение одной рафинации по полному или частичному циклу, включая дезодорацию») в Проекте изменений «Технического регламент на масложировую продукцию», пункт 7 (ТР ТС 024/2011) [9]).

Кроме того, материалы работы использованы:

- при подготовке проекта методических рекомендаций «Определение содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в кондитерской продукции»;

- в научно-исследовательской работе «Изучение содержания технологических контаминантов и вторичных продуктов окисления в пищевых жирах высокой степени переработки» (2018 год);

- в научно-исследовательской работе "Разработка, оценка эффективности и характеристика качества специализированной диетической профилактической и диетической лечебной пищевой продукции для оптимизации питания населения, в том числе пожилого и старческого возраста", раздел 5 «Изучение содержания технологических контаминантов и вторичных продуктов окисления в пищевых жирах высокой степени переработки» (2020 год).

Часть раздела по определению содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД, эфиров глицидола в пищевых маслах и жирах различного происхождения и способа обработки была выполнена в рамках гранта РФФИ (Проект № 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").

Часть раздела по изучению жирнокислотного состава и летучих соединений подсолнечных масел была выполнена в рамках гранта РФФИ (Проект №19-16-00113

«Изучение кристаллизационных свойств отдельных фракций пчелиного воска и их комбинаций для разработки пищевых олеогелей с заданными составом и свойствами»).

Соответствие диссертации плану научной специальности

Настоящая работа полностью соответствует области исследования специальности 3.2.1 Гигиена, а именно касается изучения качества пищевых продуктов и рекомендаций по их изготовлению (пункт 5 области исследований), а также разработки методических подходов к исследованию влияния факторов окружающей среды на здоровье человека (пункт 1 области исследований).

Апробация работы

Материалы данной работы были представлены на:

1. Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи материалы», Москва, 2017 г (устный доклад).
2. II школе молодых учёных «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний», Москва, 2019 г (устный доклад).
3. Конференции «Масложировая индустрия», Санкт-Петербург, 2019 г (устный доклад).
4. Конференции «Еда будущего» в рамках 28-й международной выставки продуктов питания, напитков и сырья для их производства «Продэкспо-2021», Москва, 2021 г (устный доклад).
5. Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи материалы», Москва., 2018 г (постерный доклад).
6. - IV Бизнес-форуме «Пищевая индустрия и медицина. Ответ на новые вызовы в условиях технологической изоляции», Москва, 2022 (устный доклад).

Публикации

По результатам исследований опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 – в изданиях, рекомендованных ВАК, получено 1 свидетельство о регистрации методики анализа.

Личный вклад соискателя

Личный вклад соискателя при планировании, организации и проведении исследований составил 90%. Обработка, обобщение и оформление результатов были выполнены автором данной работы самостоятельно.

Объём и структура диссертации

Работа изложена на 236 страницах машинописного текста, содержит 45 таблиц, 65 рисунков. Состоит из введения, аналитического обзора литературы, главы, описывающей материалы и методы исследований, двух глав собственных исследований, выводов, списка литературы, четырех приложений. Список литературы включает 347 источников, в том числе 20 на русском языке и 327 на английском.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика продуктов окисления масел и жиров и технологических контаминантов сложных эфиров МХПД и глицидола

1.1.1. Продукты окисления пищевых масел и жиров

Окисление масел и жиров — это многостадийный и динамический процесс, который определяется внешними условиями, а также начальным химическим составом масла или жира. Хорошо известно, что чем выше степень ненасыщенности жирной кислоты и/или масла/жира, тем быстрее происходит окисление [213], а разнообразие производимых соединений зависит от механизма [62], условий окисления [328] и типа задействованных жирных кислот. [313].

Химическое окисление масел (вне живых организмов) описывают, как *автоокисление* (под действием свободных радикалов) и *фотоокисление* (под действием O₂, тепла и света (в т.ч. ультрафиолетового излучения) жирных кислот. Автоокисление является наиболее распространённым типом окисления масел [335] и проходит через стадии образования свободных радикалов, или инициации, присоединения кислорода к жирной кислоте и обрыва цепи с образованием новых радикалов и стабильных продуктов окисления (ПО). При этом типе окисления образование ПО не начинается пока не накопится достаточное количество свободных радикалов и этот период называют индукционным. В процессе фотоокисления образование продуктов окисления начинается сразу [41], а образующиеся свободные радикалы участвуют в процессе автоокисления.

Считается, что оба этих процесса сначала формируют «первичные» продукты окисления (ППО), к которым относят главным образом гидропероксиды ЖК [41]. Современные исследования говорят о возможном формировании и других ППО, таких как гидроксины, эпоксины (одна основная функциональная группа, ФГ), а также различные эпидиоксины, гидропероксиэпидиоксины и гидроксилэпидиоксины (несколько ФГ) [335]. Эти соединения затем разлагаются до «вторичных» продуктов окисления (ВПО), которые также могут иметь одну или несколько ФГ. Основные ФГ этих соединений включают альдегидную, кетонную, спиртовую и кислотную группы, однако ВПО также могут иметь гидрокси-, гидроперокси- и эпокси-группы. Все соединения, которые образуются в результате окислительной деградации масел и жиров, условно можно условно разделить на **нелетучие** и **летучие** (низкомолекулярные) ПО.

По всей видимости, в процессе окисления масел образуется большое количество **нелетучих ПО**, однако структура большинства из них пока остаётся неизвестной. На данный момент имеются данные об образовании *альдегид глицеринов* (АГ) типа 8-оксо-

АГ, 9-оксо-АГ и 10-оксо-8-АГ, которые были получены при обжаривании во фритюре куриных и рыбных наггетсов и картофеля фри в рапсовом, высокоолеиновом подсолнечном и хлопковом маслах в течение 60 ч [41]. Вместе с *продуктами полимеризации триглицеридов* эти компоненты появляются после длительного окисления масел, тогда как *продукты гидролиза ТАГ и окисленные мономеры триглицеридов (ТАГ)* являются основными компонентами свежих масел [41]. К последним при окислении, например, трилинолеина, относятся гидроперокси-, кето- и гидроксидиены ТАГ [302]. Также сообщалось об образовании побочных продуктов окисления холестерина, таких как 7- α и 7- β -гидроксихолестерин, 7-кетохолестерин и 5- α 6- α эпоксихолестерин [301] и фитостеринов [31]

К нелетучим ПО можно отнести и *трансизомеры жирных кислот*. Ненасыщенные жирные кислоты натуральных пищевых масел и жиров природно имеют в основном *цис*-конфигурацию, в которой атомы водорода ненасыщенных двойных связей С=С ориентированы в одном направлении. Известно о присутствии в маслах также природных трансизомеров, к которым относится, например, элаидиновая (С18:1 9Т) и вакценовая (С18:1 11Т) кислоты. Термическое воздействие вызывает изомеризацию ненасыщенных жирных кислот, что приводит к образованию трансизомеров ЖК искусственного происхождения, где атомы водорода в связи С=С ориентированы в противоположном направлении. К таким изомерам, например, олеиновой кислоты (С18:1 9Ц), относится элаидиновая (С18:1 9Т) кислота, а к изомерам линолевой (С18:2 9Ц, 12Ц)- изооктадекадиеновой (С18:2 9Т, 12Т), *цис*, *транс*-линолевой (С18:2 9Ц, 12Т) и *транс*, *цис*-линолевой (С18:2 9Т, 12Ц). Дезодорация пищевых масел при стандартных температурах 200 °С – 260 °С может вызывать образование трансизомеров ЖК в количестве до 4 % в растительных маслах и до 8 % в более ненасыщенных рыбьих жирах при установленном нормативе до 2 % для очищенных масел кроме молочного жира³. Их итоговое содержание зависит от температуры дезодорации и глубины вакуума [31].

Летучая часть продуктов окисления (ПО), продуктов взаимодействия ПО [313] и терпены обуславливают характерный запах свежих масел. Рафинация и дезодорация полностью или почти полностью удаляют составляющие аромат масла вещества и ПО, которые затем начинают появляться вновь в процессе окисления. Окисление как свежих, так и очищенных пищевых масел сопровождается изменением ароматического профиля: может появляться неприятный аромат, который усиливается с увеличением срока хранения масла и его интенсивность зависит от вида образующихся соединений. Например, было показано, что 2Т,4Ц-декадиеналь, н-бутаналь и н-гексаналь оказывают

³ Согласно ТР ТС 024/2011 «Технический регламент на масложировую продукцию»

гораздо более сильное влияние на ощущение запаха прогорклости, нежели углеводороды [313]. Кроме того, в процессе окисления образуются летучие соединения, которые наравне с неприятным запахом проявляют токсические свойства [312], такие как α -, β -ненасыщенные альдегиды.

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), особенно классов ω -3, ω -6, являются основным источником α -, β -ненасыщенных альдегидов (α -, β -НА), схематичная структура которых представлена формулой ниже:



где R– любой заместитель

Из группы α -, β -НА наибольший интерес представляют окисленные α -, β -НА ($O\alpha$ -, β -НА), в структуре которых обычно присутствуют системы конъюгированных двойных связей, и/или гидрокси- [122], гидроперокси- [124] группы в C4 положении или оксо- и/или эпокси-групп в C4-C5 положении (рис. 1.1.1.1). Таким образом, к α -, β -НА относят:

- малоновый диальдегид
- глиоксаль
- 2*T*-алкенали (например 2*T*-пропеналь (акролеин) или 2*T*-бутеналь (кротональдегид))
- Ц,*T*- и 2*T*,4*T*-алкадиенали (например, 2*T*,4*T*-декадиеналь)
- 4,5-эпокси-2*T*-алкенали (например, **4,5-эпокси-2*T*-деценаль**)
- 4-гидрокси- и 4-гидроперокси-2*T*-алкенали (например **4-гидрокси-2*T*-ноненаль (ГНЕ)**, **4-гидрокси-2*T*-гексеналь (ГГЕ)**),
- 4-оксо-2*T*-алкенали (**4-оксо-2*T*-деценаль**, **4-оксо-2*T*-ундеценаль**, **4-оксо-2*T*-ноненаль (ОНЕ)**) и др. [267, 41, 124.].

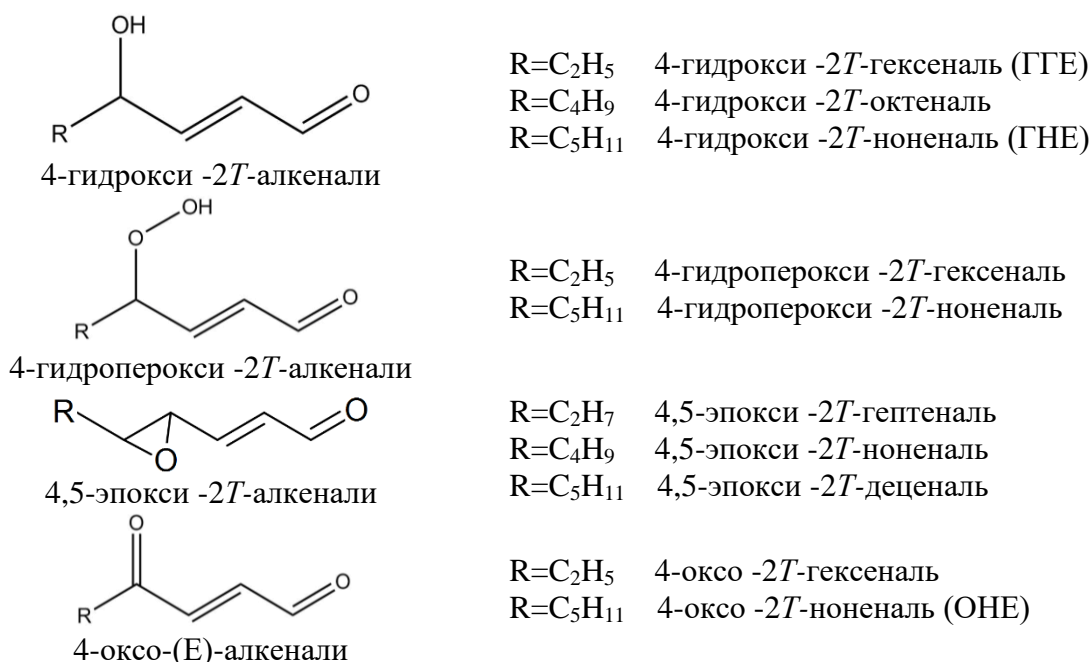


Рис. 1.1.1.1 Структура наиболее распространённых О α - β -НА в пищевых продуктах, эндогенных клетках и тканях по данным [116]

Наличие в структуре О α - β -НА двойных связей и дополнительных функциональных групп делает эти соединения очень реакционноспособными и, таким образом, представляющими потенциальную опасность для здоровья [196]. Действительно, некоторые из α - β -НА внесены в список возможных канцерогенов человека (группы 2А и 2В) [27] (рис. 1.1.1.2):

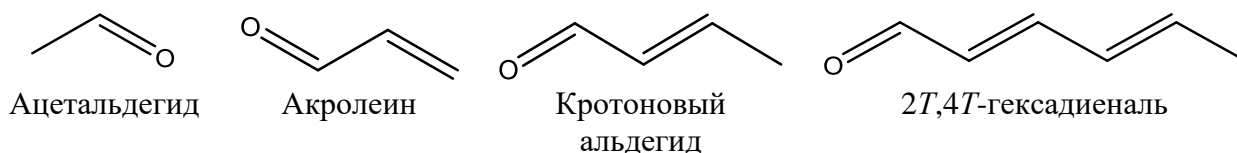


Рис. 1.1.1.2 Структура вторичных продуктов окисления растительных масел с подтверждённой канцерогенной активностью

Несмотря на наличие гидроксо-, гидроперокси-, оксо- и/или эпокси-групп О α - β -НА относятся ко вторичным продуктам окисления, поскольку их образование происходит из различных альдегидов. Одним путей их образования является разложение нестабильных 4-гидроперокси-2-алкеналей, которые в свою очередь являются продуктами гомолитического разложения гидропероксидов ПНЖК [27]. Так было показано, что 4-гидроперокси-2*T*-ноненаль является интермедиатом при образовании двух наиболее известных О α - β -НА - 4-гидрокси-2*T*-ноненала (ГНЕ) и 4-оксо-2*T*-ноненала (ОНЕ) [173]. С другой стороны было показано, что образование О α - β -НА может проходить и из простых ненасыщенных альдегидов, таких как 2-алкенали, если этот процесс катализируется металлами [237].

В пищевых растительных маслах наиболее распространёнными жирными кислотами являются олеиновая С18:1 9*Ц*, линолевая С18:2 9*Ц*, 12*Ц* и линоленовая кислоты С18:3 9*Ц*, 12*Ц*, 15*Ц*.

Олеиновая кислота С18:1 9Ц. Окисление олеиновой кислоты происходит с образованием различных первичных продуктов, включающих гидропероксиды, а также эпокси- и кето-соединения, например 9,10-эпоксистеарат [185] и 8-кетоктоадецеаноат. Геометрическая изомерия двойной связи при гидропероксиде зависит от типа окислительного процесса (рис 1.1.1.3) [185, 196, 313, 335]:

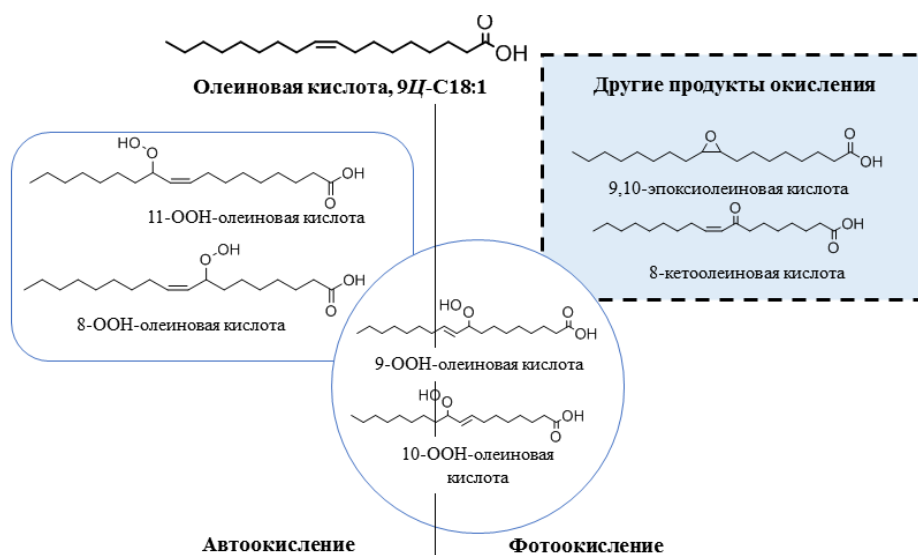


Рис. 1.1.1.3 Основные первичные продукты окисления олеиновой кислоты 9C-C18:1 [185, 196, 313, 335].

Разложение ППО олеиновой кислоты приводит к образованию различных соединений, тип которых зависит от типа гидропероксида. Так было установлено, что при гемолитическом расщеплении 8-ООН-C18:1 образует деканаль и 2-ундеценаль, 10-ООН-C18:1 – нонаналь, 9-ООН-C18:1 - 2-деценаль, 11-ООН-C18:1 – октаналь [62]. Остальные вторичные продукты окисления олеиновой кислоты представлены в таблице 1.1.1.1. Наиболее известным из этих соединений является 4-гидрокси-2*T*-ноненаль (ГНЕ), который относится к наиболее реакционноспособной группе окисленных ненасыщенных альдегидов с установленной токсичностью. ГНЕ может считаться одним из характеристичных маркеров окисления масел с высоким содержанием ЖК класса ω -9 [192, 189].

Некоторые вторичные продукты окисления олеиновой кислоты, в свою очередь, также могут образовывать ПО, причём как первичного, так и вторичного характера. Например, октаналь может разлагаться на октановую кислоту и пероксиды [313].

Линолевая кислота C18:2 9C, 12C. Окисление линолевой кислоты начинается с присоединения иона *ООН к 9, 10, 12 или 13 положению (в зависимости от типа окисления) с образованием соответствующих пероксидов (см. рис.1.1.1.4).

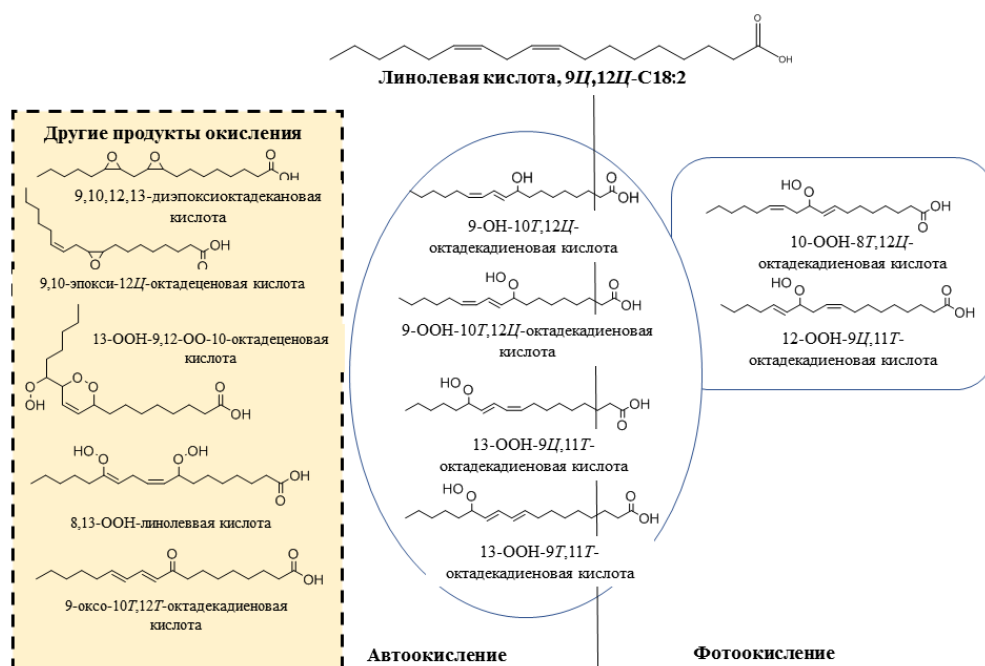


Рис. 1.1.1.4 Основные первичные продукты окисления линолевой кислоты 9*Ц*,12*Ц*-C18:2 [34, 196, 232, 313].

9-ООН-C18:2 и 13-ООН-C18:2 в свою очередь образуют ВПО, в т.ч., например, 4,5-эпокси-2*Т*-деценаль [109], 2*Т*,4*Т*-декадиеналь [288] ГНЕ, 4-оксо-2*Т*-ноненаль (ОНЕ), акролеин [100] и 2-пентилфуран, которые среди прочих являются наиболее токсичными (таблица 1.1.1.1). В целом, ГНЕ [192, 189.] наравне с 2*Т*,4*Т*-декадиеналем [288] могут считаться одними из характеристичных маркеров окисления масел с высоким содержанием ПНЖК класса ω -6 – линолевой и арахидоновой кислот.

Известно, что ГНЕ и ОНЕ образуются из линолевой кислоты через другой ВПО линолевой кислоты - 4-гидроперокси-2*Т*-ноненаль [173]. Со временем может происходить разложение и других ВПО: например, гексаналь может разлагаться до гексановой кислоты и пероксидов, 2-октеналь – до октановой кислоты, гептанала, гексенала и пероксидов, 2,4-декадиеналь до гексанала, 2-октенала, гексановой кислоты и пероксидов [313].

*Линоленовая кислота C18:3 9*Ц*, 12*Ц*, 15*Ц**. Первичные продукты окисления линолевой кислоты включают 9-, 10-, 12-, 13-, 15-, 16-гидропексиды, а также 10,12-эпидиоксиоктадекадиеновую кислоту (рис.1.1.1.5):

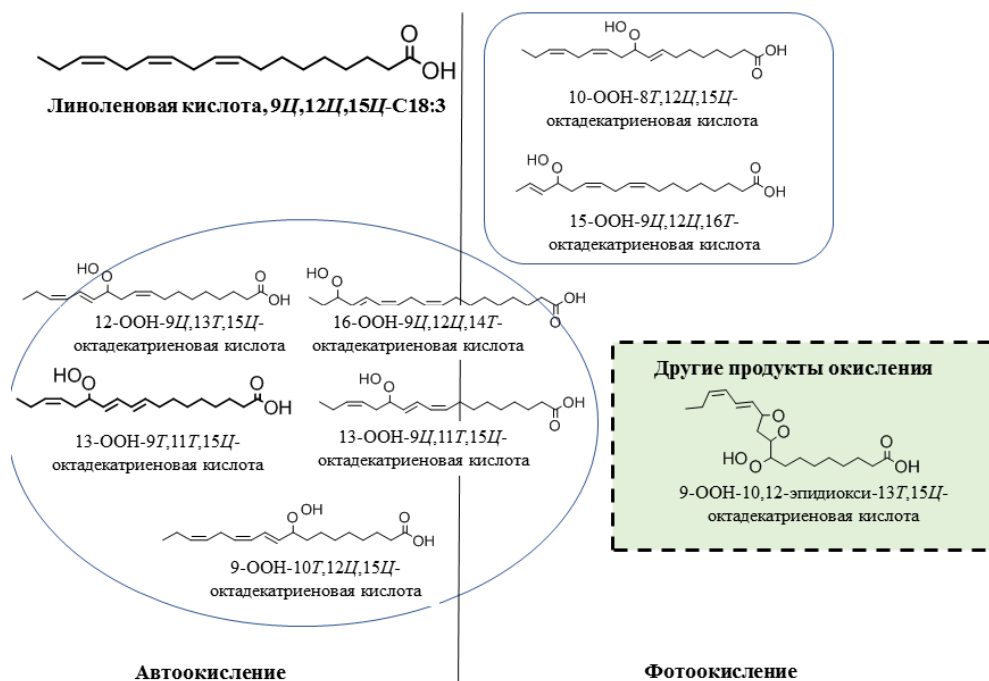


Рис.1.1.1.5 Некоторые первичные продукты окисления α -линоленовой кислоты [196, 313, 335].

При разложении гидропероксиды линолевой кислоты формируют множество соединений (см таблицу 1.1.1.1), из которых наиболее опасными считаются малоновый диальдегид, ацетальдегид, 2-пропеналь, 2,4-гептадиеналь, 4,5-эпокси-2-гептенали, 4-гидрокси-2T-гексеналь (ГГЕ) и 9,10-эпокси-12-октадецеаноат. Из них ГГЕ [192, 189.] и МДА [304] могут служить в качестве маркёров окисления для масел с высоким содержанием ПНЖК ω -3, в том числе эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот.

Таблица 1.1.1.1 Установленные вторичные продукты окисления некоторых жирных кислот по данным [313, 41, 244, 244]. Жирным отмечены соединения, обладающие токсическими свойствами.

Продукты окисления/ Жирная кислота	Олеиновая, C18:1 9C	Линолевая, C18:2 9C, 12C	Линоленовая, C18:3 9C, 12C, 15C.
Альдегиды (насыщенные)	Гептаналь, октаналь, нонаналь, деканаль,	Ацетальдегид, пентаналь, гексаналь	Ацетальдегид, пропаналь, бутаналь
Альдегиды (моно-ненасыщенные)	2-деценаль, 2-ундеценаль, 2-ноненаль	2-пропеналь (акролеин), 2-гептеналь, 2-октеналь, 2-ноненаль	2-пропеналь, 2-бутеналь, 2-пентеналь 2-,3-гексеналь, 2-гептеналь
Альдегиды (поли-ненасыщенные)	-	2,4-нонадиеналь, 2,4-декадиеналь	2,4-гептадиеналь, 3,6-нонадиеналь, 2,4,7-декатриеналь
О α - β -НА	ГНЕ	ГНЕ, ОНЕ и (Е) -4,5-эпокси-(Е) -2-деценаль	ГГЕ, 4-оксо-2-гексеналь и 4,5-эпокси-2-гептенали
Кетоны	-	3-октен-2-он	2,4-октадиен-2-он
Углеводороды	Гептан, октан,	Пентан	Этан (этен), 2-пентен, 1,4-гексадиен 2,5-октадиен
Спирты	Гептанол, 1-	1-октен-3-ол, 2-	Этанол, 2,5-октадиен-1-ол, 2-пентен-1-ол, 9,10-

	октанол	октен-1-ол, 1-пентанол	эпокси-12-октадецеаноат, 9,10-дигидрокси-12-октадецеаноат, 12,13-эпокси-9-октадецеаноат
Циклические соединения	-	2-пентилфуран	2-бутилфуран

ГГЕ - 4-гидрокси-(Е)-2-гексеналь, ГНЕ - 4-гидрокси-(Е)-2-ноненаль, ОНЕ - 4-оксо-(Е)-2-ноненаль

1.1.2. Сложные эфиры МХПД и глицидола

Текст настоящего подраздела был опубликован в [11] и приводится с незначительными изменениями.

«3-Монохлорпропан-1,2-диол (3-МХПД) и 2-монохлорпропан-1,3-диол (2-МХПД) представляют собой аналоги глицерина с атомом хлора в позиции 1 или 2 (рис. 1.1.2.1).



Рис. 1.1.2.1 Структура 3-МХПД (слева) и 2-МХПД (справа)

В свободной форме (рис. 1.1.2.1) эти соединения присутствуют в пищевых продуктах с невысоким содержанием жира, которые в процессе производства подвергаются высокотемпературной обработке или, например, кислотному гидролизу [76] (жидкие приправы вроде соевых соусов [174], хлебобулочные изделия [285], кислотные гидролизаты растительных белков и др.). В связанной форме — в виде симметричных и ассиметричных сложных ди- и моноэфиров с жирными кислотами [178] — 3-МХПД и 2-МХПД присутствуют в рафинированных пищевых маслах и пищевых продуктах, изготовленных с их использованием: (рис. 1.1.2.2).

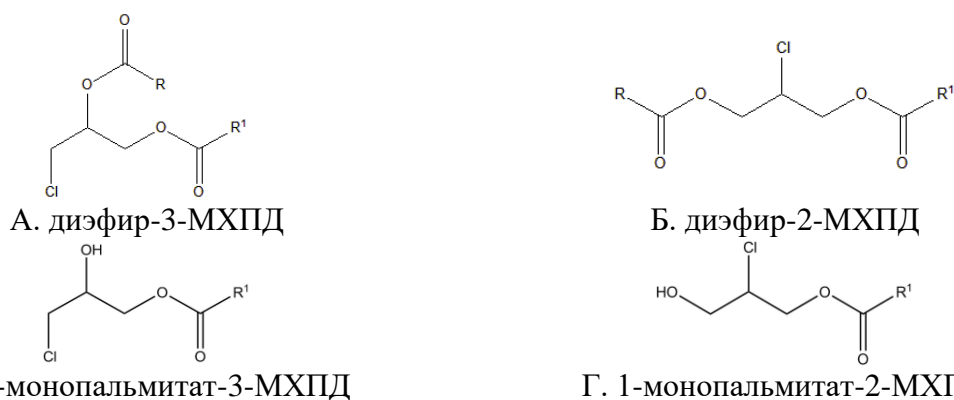


Рис. 1.1.2.2 Структура сложных эфиров 2- и 3-МХПД с жирными кислотами. R, R¹ — любые жирные кислоты.

Основными ЖК в этих соединениях являются пальмитиновая и олеиновая [315], но также обнаруживаются и другие, характерные для масел и жиров, входящих в состав соответствующего масла в аналогичном соотношении [76]. Глицидол в подобных продуктах существует в виде сложных моноэфиров [99]; структура этих соединений представлена на рис. 1.1.2.3. Первые исследования глицидиловых эфиров (ГЭ) были связаны, прежде всего, с изучением эфиров 3-МХПД [320].



Рис. 1.1.2.2 Структура глицидола (слева) и глицидилового эфира жирной кислоты (справа). R, – любая жирная кислота.

Изначально эти вещества обнаруживали в виде свободных форм в продуктах кислотного гидролиза соевого белка, таких как соевый соус [], затем было показано, что они могут присутствовать в различных маслах [], чаще всего дезодорированных [], в виде сложных эфиров с жирными кислотами. Особенное беспокойство вызывают данные по содержанию этих контаминантов в детских молочных смесях и продуктах, которые зачастую содержат гораздо большее количество МХПД и глицидола как в связанной, так и в свободной формах, чем это допустимо установленными нормами суточного потребления [40, 233]. Это создаёт определенные риски для здоровья потребителей этих продуктов [11].

Неочищенные (нерафинированные) масла в норме практически не содержат этих контаминантов [47, 67], но содержат соединения, являющиеся их предшественниками [255]. Процессы химической очистки при температурах порядка 120 °С (моноклорпропандиолы), и особенно высокотемпературной (до 265 °С) дезодорации масел (глицидол) [67] инициируют образование и накопление этих соединений в форме ди- и моноэфиров с жирными кислотами [178]. Образование хлорпропанолов требует также присутствия хлорид-ионов, наличие которых, например, в нерафинированном пальмовом масле может объясняться выращиванием масличных пальм на солёных почвах, использованием хлорированных удобрений и очищенной с хлоридом железа (III) воды [254]. В рафинированном растительном масле источником хлоридов может быть вода [200] и отбеливающие глины, используемые в процессе очистки [21]. Интересно, что хлорированные соединения, такие как $ZnCl_2$, могут способствовать образованию также и глицидиловых эфиров, хотя их структура не содержит хлор [344]. Из липидных компонентов предшественниками моноклорпропандиолов могут быть по разным данным три- [99], ди- и моноглицериды (ТАГ, ДАГ и МАГ) [42,316] а также свободный глицерин [99]. При этом ДАГ и МАГ могут иметь как природное [320], так и технологическое происхождение, например, появляться при высокотемпературной очистке [99]. ГЭ, как правило, образуются из диацилглицеринов и их образование находится в прямой зависимости от продолжительности воздействия высоких температур [99,89]. При определенных условиях образование ГЭ может происходить путём трансформации 3-МХПД [127] и наоборот.»

Помимо эфиров монохлопропандиолов, имеются данные об образовании в пищевых маслах эфиров хлорпропанолов с двумя атомами хлора в составе молекулы, свободные формы которых, особенно 1,3-дихлорпропанол, также могут обладать токсическими эффектами [128]. В растительных маслах, однако, их содержание было примерно на два порядка ниже, чем монохлорированных аналогов, а в 35 исследованных автором [171] маслах не превышало предел количественного определения (5 мкг/кг). Данные соединения, вероятно, не имеют большого значения для здоровья человека [39] и поэтому в этой работе не рассматривались.

1.2. Токсикологическая характеристика

1.2.1. Токсикологическая характеристика продуктов окисления масел и жиров

Перекисное окисление масел и жиров — это повсеместный процесс, который одинаково затрагивает как липиды пищевых продуктов, так и липиды организма. Большинство данных по токсичности продуктов окисления липидов были получены при изучении процессов нормального и патологического окисления липидов живых организмов. Развитие патологических процессов при различных заболеваниях вызывает в том числе образование большого количества различных продуктов перекисного окисления, из которых наиболее реакционноспособными считаются ненасыщенные альдегиды, особенно окисленные α -, β -ненасыщенные альдегиды ($O\alpha$ -, β -НА) [37]. Эти соединения в свою очередь легко абсорбируются из кишечника в системный кровоток и могут вызывать повреждение клеток, тканей и основных органов [213] путём связывания с различными макромолекулами организма и особенно с белками за счёт своей высокой электрофильности, формирования оснований Шиффа и аддуктов Михаэля [213]. Такие изменения в структуре белков приводят к изменению/потере их функций и/или агрегации [85]. Одновременно это объясняет широкий спектр индуцированных токсичными альдегидами патологических изменений в организме. Например, было показано, что 4-гидрокси-2*T*-гексеналь (ГГЕ) и 4-гидрокси-2*T*-ноненаль (ГНЕ) способствовали агрегации белка супероксиддисмутаза, образуя основания Шиффа и аддукты Михаэля с аминокислотными остатками лизином, гистидином и цистеином. Такое накопление агрегатов супероксиддисмутаза может быть связано, например, с развитием бокового амиотрофического склероза [85]. Аналогично эти соединения могут реагировать с глутатионом, а образующиеся аддукты способны ингибировать рост клеток [85]. Взаимодействие α -, β -НА с ДНК может происходить путём алкилирования последней, при этом образующиеся аддукты электрофил-ДНК могут быть источником генотоксичных, мутагенных и канцерогенных изменений в организме [50, 130, 203, 333].

В отсутствие патологических процессов и заболеваний регулирование уровней данных соединений в организме происходит разными путями, такими как, например, частичная детоксикация путём связывания с глутатионом или через окислительно-восстановительные реакции [169]. Поэтому невысокие концентрации токсичных альдегидов в свежих пищевых маслах, жирах и жиросодержащих продуктах, а также производных этих альдегидов с макромолекулами организма, такими как ДНК, вероятно не могут оказывать сравнительно значимого воздействия на здоровье человека [169, 308]. То же было показано для фурана и его алкилированных производных [95, 167].

Тем не менее, потребление термически окисленных жиров может представлять опасность для здоровья [216] за счёт повышенного содержания продуктов термического окисления [216, 136, 244]. При этом наиболее сильно ухудшаются функции печени, поскольку происходит разрушение её гистологической структуры из-за накопления жира и развития окислительного стресса [216, 38]. Поэтому существует необходимость контроля процессов перекисного окисления пищевых масел и жиров.

Токсикологических исследований *первичных продуктов окисления растительных масел* было проведено очень мало, что может быть связано с их высокой нестабильностью. Было показано, что эпоксиды жирных кислот, такие как 9,10-эпокси-12-октадецеиноат, могут увеличить риск сердечно-сосудистых заболеваний. Hu et al. [161] обнаружили, что 9,10-эпокси-12-октадецеиноат вызывает отёк лёгких у крыс. Liu с соавторами показали цитотоксичность эпоксидов олеиновой кислоты, которые вызывали окислительный стресс и апоптоз в культуре клеток HepG2 при обработке в дозе 500 мкМ в течение 12, 24 и 48 ч [185]. Токсичность гидропероксидов остаётся под вопросом, поскольку они, по-видимому, не всасываются в плазму крови [305].

Одними из наиболее изученных соединений с подтверждёнными токсическими свойствами являются различные трансизомеры жирных кислот, а также некоторые вторичные продукты окисления, такие как насыщенные, ненасыщенные и оксигенированные α -, β -ненасыщенные альдегиды.

Вторичные продукты окисления жирных кислот (ВПО). К наиболее часто изучаемым продуктам окисления липидов с токсическими свойствами относятся эндогенные и экзогенные альдегиды жирных кислот, которые могут иметь одну или несколько двойных связей в структуре, а также дополнительные функциональные группы – гидрокси-, гидроперокси-, оксо-, эпокси- и проч. Наиболее важные представители вторичных продуктов окисления с точки зрения опасности для здоровья человека представлены в таблице 1.2.1.1:

Таблица 1.2.1.1 Токсикологическая характеристика наиболее изученных вторичных продуктов окисления липидов эндогенного и экзогенного происхождения.

Название	LD50 мг/кг массы тела, орально	Канцерогенность	Генотоксичность	Мутагенность	Класс опасности	TDI, мкг/кг массы тела в день	Действие
4-гидрокси-2Т -алкенали							
4-гидрокси- 2Т-гексеналь (ГГЕ)	110 (мыши) [229]	-	+ (in vitro) [45], + (генотокс. по отношению к гемоцитам и клеткам средней кишки личинок <i>D. melanogaster</i>) [88], образование лимфомы у мышей [244]	Индукция замещения оснований в штаммах Эймса TA104 56ТА100 в зависимости от дозы [244], показана мутагенность в тесте соматической мутации и рекомбинации крыла дрозофилы in vivo [87]	-	-	Влияние на жизнеспособность клеток путём образования аддуктов с белками [250]
4-гидрокси-2Т -ноненаль (ГНЕ)	68,6 (мыши) [238] 35 (крысы) [217]	Колоректальный рак [201], опосредованный канцерогенез [102,112] и цитотоксичность для раковых клеток [108]	Снижение частоты сестринских хроматидных обменов [92], нарушение митотического веретена [309]	Аддукты с ДНК имеют мутагенную активность [102,112]	-	-	Индуктор воспаления и апоптоза, дезактиватор ключевых белков различных органелл и клеток [250,56,53]
4-оксо-2Т -алкенали							
4-оксо-2Т -ноненаль (ОНЕ)	-	Опосредованный канцерогенез путём повреждения ДНК [27]	+ (генотокс. по отношению к гемоцитам и клеткам средней кишки личинок <i>D. melanogaster</i>) [88], анализ лимфомы мышей [244]	Показана мутагенность в тесте соматической мутации и рекомбинации крыла дрозофилы in vivo [87]			Ковалентно модифицирует белки и ДНК [112, 53], блокировка функций митохондрий [249]
Простые альдегиды							
Ацетальдегид	661 (крысы), 900 (мыши) [219]	Группа 2В [27], опосредованный канцерогенез [57], способствует развитию рака	Образует аддукты ацетальдегид-ДНК [57]	Вызывает точечные мутации в гене альдегиддегидрогеназы 2 (ALDH2) [262]	3 [2]	0,1 (IPCS), 0.0-2500 (FAO/WHO) [170], 0.00257 (при вдыхании)	Образует аддукты ацетальдегид-ДНК [57]

		роголотки [262]				[234]	
Малоновый диальдегид (МДА)	632 (крысы) [75] 606 (мыши) [222]	Группа 3 [27], Опосредованный канцерогенез [112]	Образование аддуктов с белками, в т.ч. ДНК [111, 52]	Аддукты с ДНК имеют мутагенную активность [112]		-	
Глиоксаль	200 (крысы) 400 (мыши) [223]	Способствует росту опухоли в кишечнике у мышей [291]	+ in vitro образует хромосомные абберации, вызывает обмены сестринских хроматид, разрывы одностранных ДНК [291] и in vivo [291, 252]	+ (мутагенную активность in vitro)[291]	-	-	Образование потенциально генотоксичных аддуктов с ДНК[252, 277]
Пропаналь	1400 (крысы) [220]	Нет данных	Нет данных	Повреждения ДНК, мутации в соматических клетках млекопитающих, мутагенность для штамма <i>S. typhimurium</i> TA1534, увеличение хромосомных аббераций в эмбриональных клетках китайского хомячка [299]	-	-	Раздражение дыхательных путей (вплоть до атрофии обонятельного эпителия) и сердечно-сосудистые нарушения [299]
Пентаналь	5660 мкл/кг (крысы) [283] 6400 (мыши) [221]	Нет данных	Нет данных	Повреждения ДНК, мутации в соматических клетках млекопитающих [221]	-	-	-
2Т-алкены							
Акролеин	26 (крысы) 13.9 (мыши) [224]	Группа 2А [27]Опосредованный канцерогенез [112]	Образование лимфомы мышей [244], генотоксичность в хромотесте SOS [93]	Аддукты с ДНК имеют мутагенную активность [112], показана мутагенность в тесте соматической мутации и рекомбинации крыла дрозофилы in vivo [87] и в тесте с использованием штамма TA100 <i>Salmonella typhimurium</i> [93]	2 [2]	7,5 (IPCS), 0.0005 (орально) [234]	Репродуктивная токсичность [246]
Кронональдегид	80 (крысы), 104 (мыши) [218]	Группа 2В [27], Опосредованный канцерогенез [112]	+ [150], Образование лимфомы мышей [244]	Аддукты с ДНК имеют мутагенную активность [112], показана мутагенность в тесте соматической мутации	2 [2]		

				и рекомбинации крыла дрозофилы <i>in vivo</i> [87]			
Транс-2-пентеналь	244 (мышь, внутрибрюшинно) [225]	-	-		-	-	-
Транс-2-гексеналь	780 (крысы) [110] 685 (мышь) [226]	Образование аддуктов ДНК [157, 118]	Генотоксичное повреждение клеток [157]	Индукция замещения оснований в штаммах Эймса TA104 и TA100 в зависимости от дозы [244]	-	-	Апоптоз кардиомиоцитов [251]
Транс-2-гептеналь	1300 (крысы) [227]			+ (<i>S. Typhimurium</i>) [93]			
Транс-2-деценаль	5 (крысы) [228]			Мутагенен по отношению к <i>Salmonella Typhimurium</i> TA98 и TA100 [321]			
2Т,4Т-алкадиены							
(Е,Е)-2,4-гексадиеналь	300 (крысы) [51]	Группа 2В [27], на основании увеличения случаев плоскоклеточных новообразований преддверия желудка самцов и самок крыс F344 / N и самцов и самок мышей B6С3F1 [64].	Генотоксичное повреждение клеток [157]	Мутагенное действие на штамм <i>S. typhimurium</i> TA100 [236]	-	-	Гиперплазии преддверия желудка, обонятельная атрофия или некроз носа [64]
(Е,З)-2,4-нонадиеналь	-	-	Индукцированная фрагментация ДНК в клетках NaCaT [164]	Мутагенное действие по отношению к <i>Salmonella Typhimurium</i> TA98 и TA100 [321]	-	-	Липофильный фактор повреждения клеток [164]
(Е,Е)-2,4-декадиеналь	?	Индукция пролиферации клеток, образование аддуктов ДНК [66,333]	Не выявлена [44, 329]	Мутагенное действие по отношению к <i>Salmonella Typhimurium</i> TA98 и TA100 [321], мутагенность не выявлена <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> [65]	-	100 (NOAEL, мышь и крысы) [65]	Снижение массы тела, местные поражения контактирующих тканей, например роговицы глаз [329] или легких [181] повреждение эндотелиальных клеток за счет нарушения

							функции митохондрий и аутофагического потока [140]
Фуран и его производные							
Фуран	5.2 (внутрибрюшинно, крысы) 7 (внутрибрюшинно, мыши) [209]	Группа 2В [27], Гепатоцеллюлярная аденома и карцинома постоянно обнаруживались как у крыс, так и у мышей, холангиокарцинома у крыс [46, 96]	Достоверно не установлена [46]	Достоверно не установлена [46]	3 [2]	0.001(орально) [234]	Токсичен для печени грызунов после острого или хронического перорального воздействия, аддукты и продукты разложения, образованные с белками и аминокислотами, и конъюгаты с клеточными (поли) аминами [96]
2-пентилфуран	1200 (мыши) [209]		Не выявлена [95]			30 (NOAEL)	Нефротоксичность, повреждения печени и легких (3-пентилфуран и гомологи) [339]

Из всех вторичных продуктов окисления липидов наиболее опасными для здоровья считаются *окисленные α -, β -ненасыщенные альдегиды (О α -, β -НА)*. К ним относятся оксо-, гидрокси-, гидроперокси- и эпокси-производные различных алкеналей в транс-конфигурации.

Повышенная реакционная способность данных соединений по сравнению с остальными альдегидами объясняется наличием более одного реакционного центра, что позволяет им реагировать с аминокислотами в пептидах и белках, а также с липидами фосфоэтаноламина, таким образом изменяя их биологическую активность [300]. (Текст подраздела частично опубликован в [14]). «Для многих из данных соединений в токсикологических исследованиях была показана цито- и генотоксичность [124], канцерогенность и мутагенность [18]». Например, **4-гидрокси-2*T*-ноненаль** в дозе 25 мкМ вызывал почти 100% лизис культуры диплоидных фибробластов человека в течение одного дня [163]. Генотоксичные свойства ГНЕ проявляются через его способность связываться с остатками лизина с образованием оснований Шиффа, а также присоединяться к остаткам гистидина, аргинина, глутамина и аспарагина посредством реакции Михаэля [343].

Более реакционноспособным, чем ГНЕ является **4-оксо-2*T*-ноненаль (ОНЕ)** [249, 282], который модифицирует нуклеофильные молекулы и трансдуцирует окислительно-восстановительную передачу сигналов посредством собственных реакций с белками [289]. Сшивание ОНЕ белков в липопротеинах высокой плотности (ЛПВП) вызывает дисфункцию ЛПВП и таким образом способствует атерогенезу, особенно у лиц, страдающих гиперхолестеринемией [202]. В тесте Эймса на штаммах TA104 и TA100 ОНЕ, 4-гидрокси-2*T*-гексеналь (ГГЕ), и 2*T*-гексеналь проявляли мутагенные свойства посредством замещения оснований [244]

Простые альдегиды (алканали). Простейшим представителем алкеналей является **ацетальдегид**, который является раздражителем дыхательных путей [273, 220] и является потенциальным канцерогеном человека (группа 2В) (рис. 1.1.1.2). Наиболее выраженно канцерогенные эффекты ацетальдегида проявляются в ротоглотке при употреблении этанола в составе алкогольных напитков, для которого ацетальдегид является первым метаболитом [262].

Малоновый диальдегид (МДА) является цито- и генотоксичным продуктом окисления липидов, причём вероятность его образования и количество повышается с увеличением степени ненасыщенности масла [191]. По данным IARC МДА не проявляет достоверных канцерогенных свойств (группа 3) [27], однако он является одним из основных биомаркеров окислительного стресса и перекисного окисления липидов,

концентрация которого в организме повышается при многих заболеваниях [298]. Кроме того, благодаря своей электрофильности он может присоединяться к остаткам лизина, однако, в отличие от других реакционноспособных альдегидов, не способен к агрегации белков [343]. Иногда этот альдегид также используют в качестве индикатора степени окисления пищевых масел (определение тиобарбитурового числа). Однако для масел, богатых насыщенными или мононенасыщенными ЖК такой маркер является неподходящим [191].

Одним из возможных продуктов перекисного окисления липидов является также альдегид **глиоксаль**, который потенциально может обладать мутагенными и генотоксичными свойствами, реагируя с одноцепочечной и двуцепочечной ДНК, что было показано на примере клеточной культуры тимуса телёнка [252]. В эксперименте на мышах был показан также его онкогенный потенциал для тонкого кишечника [291]. Основным источником глиоксаля, однако, являются углеводы, особенно сильно в организме его уровень растёт при гипергликемии [291].

Имеются ограниченные данные по токсичности гомологов ацетальдегида. Например, в тесте по индукции внепланового синтеза ДНК и цитотоксичности пропаналь (в дозе 10-100 мМ), бутаналь (в дозе 10-100 мМ), пентаналь (в дозе 3-30 мМ) и гексаналь (в дозе 3-30 мМ) вызывали дозозависимое увеличение чистого количества ядерных зёрен только в первичной культуре гепатоцитов крысы, но не человека; хотя цитотоксичность увеличивалась с увеличением длины углеродной цепи [194]. Поэтому предполагается, что такие альдегиды не вызывают генотоксических эффектов в печени человека, хотя необходимы дальнейшие исследования [273]

Транс-2-алкенали и -алкадиенали. Альдегиды данной группы проявляют более выраженные токсические свойства по сравнению с алканалями [220]. В большинстве случаев токсичность в данной группе соединений усиливается по мере увеличения количества двойных связей в каждой молекуле, а также по мере удлинения углеродной цепи [163]. Так, токсичные свойства алкеналей и алкадиеналей к штаммам *S. Typhimurium* снижались в порядке транс-транс-2,4-декадиеналь (C10) > транс-транс-2,4-нонадиеналь (C9) > транс-2-деценаль (C10) > транс-2-ундеценаль (C11) [321].

Простейшим и наиболее опасным для здоровья человека представителем этой группы является **акролеин** (рис. 1.1.1.2), которому статус возможного канцерогена человека (группа 2А) был присвоен в 1988 г. Тогда было показано, что акролеин вызывал увеличение частоты аденом коры надпочечников у самок крыс [312].

Кротоновый альдегид (группа 2В) (рис. 1.1.1.2) также способен образовывать аддукты с ДНК, что определяет его как генотоксичное вещество [341].

2Т-гексеналь (но не 2Т,4Т -гексадиеналь) в дозе 100 мкМ вызывал более чем 80%-истощение глутатиона и окислительный разрыв ДНК в культуре клеток млекопитающих в течение 3 часов после инкубации, хотя имела место также репарация ДНК [157].

2Т,4Т-нонадиеналь в тесте на трёхмерной модели кожи человека (культура кератиноцитов HaCaT) индуцировал фрагментацию ДНК вызывая морщины и образование аномальных чешуек в дозе 40 мкМ [164]

В зависимости от продолжительности воздействия и дозы **2Т,4Т-декадиеналь** (*mm*-ДДЕ) индуцировал повреждения ДНК, вызывал сайт-специфические патологические изменения, такие как эпителиальная гиперплазия [288], воспалительные реакции [311], а также проявлял цитотоксические [329] и генотоксические свойства, индуцировал апоптоз эндотелиальных клеток при пероральном потреблении [141], что было продемонстрировано на *in vitro* и *in vivo*. Показано, что *mm*-ДДЕ связан с распространением аденокарциномы лёгких [321], желудка и кишечника и может способствовать изменению калиево-кальциевого баланса вызывая аритмогенез сердечной мышцы, например при вдыхании паров окисленного масла [158]. В тесте мутагенности с использованием штаммов TA98 и TA100 *Salmonella Typhimurium* *mm*-ДДЕ был наиболее мутагенным в дозе 10 мкг на чашку из всех соединений, включая 2Т,4Т-нонадиеналь, 2Т-деценаль и 2Т-ундеценаль [321].

Интересно, что выраженные токсические эффекты алкеналей и алкадиеналей могут проявляться в той же мере и к раковым клеткам: так например, 2Т-пентеналь заметно ингибировал роста клеток карциномы мыши Colon-26, тогда как рост нормальных клетки мыши клона А31 BALB / 3Т3 это соединение практически не подавляло [85].

Фуран и алкилфураны. Фуран (группа 2В) и алкилфураны представляют собой липофильные кислородные гетероциклы, которые являются промышленными загрязнителями [167]. Эти соединения встречаются в широком спектре термически или УФ-обработанных пищевых продуктов [139] (рисунки 1.2.1.1).

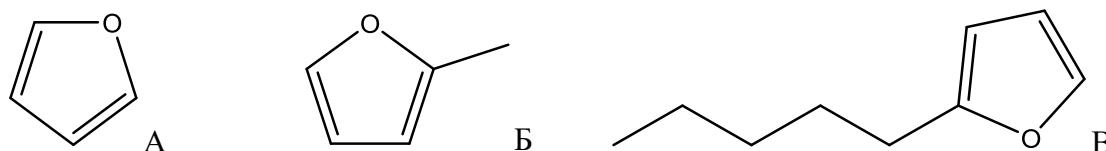


Рис. 1.2.1.1 Структура фурана и его алкилпроизводных, распространённых в пищевых продуктах. Слева направо: фуран, 2-метилфуран, 2-пентилфуран.

В пищевых маслах образование фурана и алкилфуранов связывают с окислением полиненасыщенных жирных кислот [167], особенно α -линоленовой кислоты [245]. Образование алкилфуранов может происходить через формирование α -, β -ненасыщенных альдегидов: например было показано, что (Е)-2-гексеналь образует 2-этилфуран через 4-гидрокси-2-гексеналь, (Е)-2-гептеналь – 2-пропилфуран через 4-

гидрокси-2-гептеналь, а 4-гидрокси-2-ноненаль является предшественником 2-пентилфурана [310]. Таким образом 2-пентилфуран может быть третичным продуктом окисления линолевой кислоты [307].

В других пищевых продуктах образование фурана и алкилфуранов связывают с присутствием аскорбиновой кислоты [139, 245], каротиноидов, углеводов и аминокислот [167]

В исследованиях на животных было установлено, что потребление таких соединений как 2-, 3-метилфуран, 2-, 3-этилфуран, 3-пентилфуран и других вызывало появление новообразований в печени у крыс (гепатоцеллюлярными аденомами или карциномами) [90] и мышей [318], оказывало нефротоксичное [339, 318] и пневмотоксичное [317] действие в организме у мышей. Было высказано предположение, что токсичность алкилфуранов тем выше, чем короче длина алкильного хвоста [317]. Генотоксические эффекты 2-метилфурана отсутствовали в 28-дневном эксперименте на самцах крыс Sprague-Dawley [143], а минимальный уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов по данным [143] составил 5 мг/кг м.т./сут, а по данным JECFA - 26 мг/кг м.т./сут [167]. Последний уровень используется в качестве эталонного при оценке рисков потребления подобных соединений.

Трансизомеры жирных кислот. Известно, что трансизомеры ЖК могут вызывать различные эффекты, связанные с сердечно-сосудистыми заболеваниями, в том числе инсульты и сердечные приступы, повышение смертности от всех причин и ишемической болезни сердца. Также они могут оказывать атерогенное и провоспалительное действие [31]. Доказано отрицательное влияние трансжирных кислот на липиды крови, включая повышение концентрации холестерина ЛПНП и снижение концентрации холестерина ЛПВП [131].

Другие соединения. Недавно была установлена структура нескольких новых оксилипинов, которые потенциально могут проявлять токсические свойства благодаря присутствию одной или сразу нескольких реакционноспособных функциональных групп в структуре молекулы. К таким соединениям относятся альдегид глицерины [41], дигидроперокси-неконъюгированные диены, гидроперокси-эпоксимоноены, гидроксипероксиэпоксимоноены, кето-эпоксимоноены, гидроксикето-моноены, кето-гидроксиперокси-структуры и эпоксимоноены, которые были обнаружены методом ^1H ЯМР в кукурузном масле. [33]. Известно, что альдегид глицерины могут влиять на структуру и функцию клеточных мембран, включая активность рецепторов [119], а также вызывать перекисное окисление липидов печени [162].

1.2.2. 2-МХПД, 3-МХПД, глицидол и их эфиры с жирными кислотами 3-МХПД и сложные эфиры 3-МХПД с жирными кислотами.

Классификация IARC (3-МХПД): негенотоксичный канцероген, группа 2Б .

Основные органы-мишени (3-МХПД): печень, почки и семенники.

LD₅₀: 3-МХПД 150 мг/кг массы тела в день (крысы), 191 мг/кг (мышь) [99]; 1-монопальмитат-3-МХПД 2677 мг/кг массы тела (мышь), 1,2-дипальмитат-3-МХПД >5000 мг/кг массы тела (мышь) [182]

NOAEL (наивысший уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов): 1 мг/кг м.т. в день [94].

В 2001 году 3-МХПД был классифицирован Научным комитетом Европейской комиссии по пищевым продуктам (SCF) как негенотоксичный пороговый канцероген [274]. Это заключение было сделано на основе долгосрочного исследования, проведённого на крысах. В ходе анализа было обнаружено увеличение числа доброкачественных опухолей при воздействии 3-МХПД, которые являлись результатом либо негенотоксических механизмов [274], либо хронического гормонального дисбаланса (фибромы молочных желёз у самок, опухоли клеток Лейдига у самцов), либо устойчивой цитотоксичности и хронической гиперплазии (развитие опухолей почек) [73]. Хотя отдельные данные свидетельствовали о наличии генотоксичности 3-МХПД [259], в 2004 году Объединённый комитет экспертов ФАО и ВОЗ по пищевым добавкам (JECFA) пришёл к выводу об отсутствии механизма повреждения ДНК при развитии неоплазии у крыс, т.е. об отсутствии генотоксичности 3-МХПД *in vivo* [280]. Это также подтвердилось более современными исследованиями [22].

На сегодняшний день показаны множественные токсические эффекты воздействия 3-МХПД в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, хотя точный механизм повреждающих клетки и органы влияний остаётся неизвестным [188]. В общем случае один из путей токсического влияния 3-МХПД в клетках может быть связан с иницированием митохондриальной дисфункции [211] и митохондриального апоптотического пути [159] путём нарушения системы окислительного фосфорилирования в митохондриях и высвобождение из них цитохрома в цитозоль [230]. Это в конечном итоге приводит к активации апоптоза клеток. Другой предполагаемый механизм токсичности 3-МХПД включает ингибирование гликолиза [55] и, как следствие, подавление клеточного метаболизма [211].

Наиболее тяжёлое токсическое воздействие 3-МХПД приходится на *репродуктивную систему*. Современные исследования показали, что 3-МХПД способен вызывать повреждения и атрофию семенников в 4-недельном эксперименте на самцах

крыс [326] и нарушение функции сперматозоидов за счёт aberrантной экспрессии белков теплового шока, изменений в организации цитоскелета и динамике микротрубочек, связанных с подвижностью сперматозоидов. Также было продемонстрировано, что 3-МХПД вызывает ингибирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) и этот механизм, вероятно, лежит в основе возникновения индуцированного 3-МХПД бесплодия [266]. При этом имеются данные, что такие повреждения функции семенников могут стать необратимыми [326].

Кроме того 3-МХПД способен проявлять *нефротоксичность*, а именно увеличение веса почек, гиперплазию канальцев, некроз почечных канальцев и хроническую прогрессирующую нефропатию [69, 101], хотя весьма вероятно, что эти изменения могут быть обратимы [326]. С другой стороны исследования на клетках проксимальных канальцев почки человека НК-2 показали ограниченную способность 3-МХПД вызывать повреждения клеток [212], что может объясняться ограниченной применимостью современных моделей *in vitro* для изучения метаболизма и токсичности 3-МХПД. [270]

Также были отмечены *гепатотоксические* эффекты в эксперименте на клетках HepG2 [188] и способность к *ингибированию дифференцировки мышц* посредством подавления экспрессии нескольких генетических факторов [175]

Токсическое влияние сложных эфиров 3-МХПД обычно связывают с токсичностью 3-МХПД, который высвобождается в процессе гидролиза в кишечнике [266]. Хотя имеются отдельные исследования, касающиеся негативного влияния моно- [331] и диэфиров 3-МХПД на клетки почек и печени в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [182, 142], в целом сами по себе эти соединения могут быть классифицированы как низкотоксичные [182], поскольку не являются системно доступными [26; 60].

2-МХПД и сложные эфиры 2-МХПД с жирными кислотами.

Классификация IARC (2-МХПД): - .

Основные органы-мишени (2-МХПД): поперечнополосатые мышцы, сердце, почки.

LD₅₀: 2-МХПД – 50-60 мг/кг м.т. у самцов крыс линии Sprague-Dawley [99]; монопальмитат-2-МХПД и дипальмитат-2-МХПД - более 5000 мг/кг массы тела у швейцарских мышей [342].

NOAEL (наивысший уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов): 2 мг/кг м.т. в день [268]

Изучение токсических эффектов 2-МХПД началось позже, чем 3-МХПД. На момент публикации объединённого отчёта EFSA по оценке токсичности, распространённости в продуктах питания и поступления организм 3-МХПД, 2-МХПД, глицидола и их эфиров в 2016 году имеющиеся данные не позволяли сделать какого-либо

заклучения о токсичности 2-МХПД и его эфиров. Также отсутствовали данные по генотоксичности 2-МХПД и его эфиров [99].

Несмотря на схожесть структуры 2- и 3-МХПД, эти вещества оказывают разное воздействие на организм [271-59]. В субхроническом исследовании на крысах, получавших 2-МХПД ежедневно в количестве 30 мг/кг м.т. в течение 28 дней было показано наличие тяжёлых токсических эффектов в поперечно-полосатых мышцах, сердце, почках и печени [268]. Высокие дозы при продолжительном воздействии 2-МХПД вызывали вакуолизацию цитоплазмы и лизис миоцитов, наиболее сильными были повреждения в миокарде [99]. Также были обнаружены токсические эффекты в отношении транскриптомных ответов в почках, печени и семенниках крыс [99, 59,106] и протеомные эффекты в сердце [271]. 28-дневный эксперимент с применением субтоксичных доз в 10 мг/кг м.т. 2-МХПД самцам крыс выявил токсические эффекты 2-МХПД по отношению к почкам [105]. Однократно вводимые высокие дозы 2-МХПД, например 100 мг/кг м.т., не вызывали значительной токсичности и окислительный стресс у самцов репортерных мышей линии НОТТ [272].

Аналогично сложным эфирам 3-МХПД, сложные эфиры 2-МХПД сами по себе токсичными не являются [342], но могут быть потенциально токсичными за счёт высвобождения 2-МХПД в процессе метаболизма в клетках кишечного эпителия [58]

Глицидол и сложные глицидиловые эфиры с жирными кислотами.

Классификация IARC (глицидол): генотоксичный канцероген, группа 2А

Основные органы-мишени (глицидол): ДНК, ЦНС

LD₅₀: 420 мг/кг веса тела для крыс, 431 мг/кг веса тела для мышей [84].

NOAEL (наивысший уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов): 48,8 мг/кг м.т. в день (взрослые самки крыс Sprague Dawley), 18,5 мг/кг м.т. в день (потомство крыс Sprague Dawley) [30].

Глицидол представляет собой кластоген прямого действия [23]. Наличие эпоксидного кольца в структуре молекулы глицидола позволяет ему ковалентно связываться с клеточными макромолекулами, например, с ДНК и другими белками вроде гемоглобина [1]. Это обуславливает его *генотоксичность* и *способность вызывать различные мутации* [99], частота возникновения которых может быть эквивалентна мутагенному воздействию ионизирующего излучения [1].

Предполагается, что механизм генотоксичности глицидола может быть связан с его способностью вносить изменения в процесс метилирования ДНК [276], или вызывать окислительное и алкилирующее повреждения [148].

Генотоксичность глицидиловых эфиров, вероятно, является более слабой по сравнению с генотоксичностью глицидола и может быть связана с образованием свободного глицидола в процессе метаболизма в организме [147].

Наиболее широко *канцерогенные* свойства глицидола были изучены в двухлетнем эксперименте на крысах, которым ежедневно перорально вводили 25–50 мг/кг м.т. глицидола. Основные опухолевые изменения включали развитие перитестискулярных мезотелиом; фиброаденом молочной железы; глиом головного мозга; аденом и карцином фолликулярных клеток щитовидной железы; папиллом и карцином желудка; аденоматозных полипов и карцином кишечника; аденом кожи и аденокарцином сальной железы и базальноклеточных опухолей, а также лейкоз. [235].

Известно также наличие *нейротоксических* эффектов глицидола. Так, например, глицидол вызывал повреждение аксонов в центральной и периферической нервной системе [29], абerrации в субгранулярной зоне головного мозга взрослых крыс [30] и отрицательно влиял на пластичность нейронных сетей в широких областях мозга [29]. Также была отмечена способность глицидола подавлять гены, связанные с функцией аксона и синаптической передачей в слое зубчатых гранулярных клеток, поясной коры головного мозга и червя мозжечка. [99]

Известно также о синергетической токсичности 3-МХПД и глицидола по отношению к почкам, лёгким, семенникам и сердцу у мышей линии C57BL/6. [183].

Несмотря на широкий спектр токсических, канцерогенных и мутагенных эффектов глицидола, его реальное влияние на организм может быть менее негативным, чем принято считать. Так, например, известно о частичной дезактивации глицидола ферментами печени при пероральном воздействии [99]. Кроме того имеются данные о частичном преобразовании глицидола и его эфиров в 3-МХПД в желудке, двенадцатиперстной кишке и слепой кишке, как было показано в эксперименте с крысами [240]. Отчасти это может объясняться кислой средой, например в случае желудка [25]. Тем не менее уровень содержания глицидиловых эфиров в пищевых продуктах должен быть как можно более низким в соответствии с принципом ALARA (as-low-as-reasonably achievable) [103].

1.3. Нормативное регулирование

1.3.1. Нормативное регулирование первичных и вторичных продуктов окисления растительных масел и животных жиров.

На сегодняшний день к единым официально нормируемым показателям окислительной порчи различных масел и жиров относятся:

- Перекисное число (далее ПЧ), характеризующее содержание первичных продуктов окисления главным образом в рафинированных маслах (в нерафинированных маслах этот показатель является характеристикой самого масла)
- Анизидиновое число (далее АЧ), показывающее содержание вторичных продуктов окисления, главным образом 2-алкеналей и 2,4-алкадиеналей.
- ТОТОХ, интегральный показатель, характеризующий общую степени окисления.

$$\text{ТОТОХ} = 2 * \text{ПЧ} + \text{АЧ}$$

Согласно пищевым международным стандартам комиссии Кодекса Алиментариус все эти показатели относятся к *показателям качества* пищевых масел [79-82]. Требования по ПЧ могут применяться заинтересованными лицами в добровольном порядке; их содержание в маслах не подлежит обязательному контролю со стороны надзорных органов. Принято, что если продукт превышает установленные нормативы по ПЧ, но соответствует основным, то такой продукт все же соответствует стандартам Кодекса Алиментариус. Это не распространяется на рыбные жиры и нерафинированное масло ши, для которых требования по утверждённым показателям окисленности являются обязательными.

Несмотря на членство в комиссии Кодекса Алиментариус, показатель ПЧ в России входит в число показателей безопасности (ТР ТС 024/2011 и ТР ТС 021/2011). Эти документы устанавливают перекисное число как основной показатель окислительной порчи масел; соответствие установленным пределам ПЧ обязательно для всех ввозимых и/или производимых на территории России типов масел.

В таблице 1.3.1.1 представлены сравнительные значения нормативов по перекисному числу для разных типов масел.

Таблица 1.3.1.1 Нормирование перекисного числа для различных групп масел, жиров и масложировых продуктов в России и странах Европейского Союза. Стандарты КА – стандарты Кодекса Алиментариус для различных типов масел.

	ТР ТС 024/2011	ТР ТС 021/2011	Стандарты КА*
Группы продуктов/Единицы измерения	Не более, ммоль акт. О/кг	Не более, ммоль акт. О/кг	Не более, мэкв. акт. О/кг
Растительные масла (кроме оливковых масел)			
Все виды растительных масел и их фракции	10	-	10-15 ¹²
Продукты переработки растительных масел	10	-	
Нерафинированное масло ши		-	10-15 ³⁴
Оливковые масла			
Масло оливковое нерафинированное высшего качества	20	-	20 ¹
Масло оливковое нерафинированное	20	-	20 ¹
Масло оливковое рафинированное с добавлением масел оливковых нерафинированных	15	-	20 ¹

Масло оливковое из выжимок рафинированное с добавлением масла оливкового нерафинированного	15	-	20 ¹
Масло оливковое рафинированное	5	-	10 ¹
Масло оливковое из выжимок рафинированное	5	-	10 ¹
Животные жиры			
Животные жиры и продукты их переработки	10	-	10 ⁵
Рыбные жиры			
Рыбные жиры и продукты их переработки	10	10	5 ⁶
Масложировые продукты			
Спреды растительно-сливочные, спреды растительно-жировые, смеси топленые растительно-сливочные, смеси топлено-растительно-жировые	10	-	-
Соусы на основе растительных масел, майонезы, соусы майонезные, кремы на растительных маслах	10	-	-
Сливочно-растительный спред, сливочно-растительная топленая смесь	-	10	-

*КА – Кодекс Алиментариус

¹Стандарт Кодекса Алиментариус для поименованных растительных масел CXS210-1999 [79]

²Для масел нерафинированных не более 15 мэкв акт. О/кг, для масел рафинированных не более 10 мэкв акт. О/кг.

³Стандарт Кодекса Алиментариус для нерафинированного масла ши CXS325R-2017 [81]

⁴Для масла ши I сорта не более 10 мэкв акт. О/кг, для масла ши II сорта 11-15 мэкв акт. О/кг

⁵Стандарт Кодекса Алиментариус для поименованных животных жиров CXS211-1999 [80]

⁶Стандарт Кодекса Алиментариус для рыбных жиров CXS329-2017 [82]

В России для всех пищевых масел и масложировых продуктов вне зависимости от степени очистки жирового компонента перекисное число должно быть не более 10 ммоль акт. О/кг масла за исключением оливковых масел и жиров как компонентов детского питания и питания беременных. Перекисное число в оливковых маслах нормируется в зависимости от типа отжима и очистки и не должно превышать 5-20 ммоль акт. О/кг масла. Кроме того, ГОСТ Р 53776-2010⁴ содержит требование по ПЧ не более 0,9 ммоль акт. О/кг.

Показатель перекисного числа в стандартах Кодекса совпадает для рафинированных растительных масел, нерафинированного масла ши I сорта и всех животных жиров и составляет не более 10 мэкв акт. О/кг. В нерафинированных растительных маслах и нерафинированном масле ши II сорта этот показатель составляет ≤15 мэкв акт. О/кг (нерафинированные оливковые масла и смеси оливковых масел ≤20 мэкв акт. О/кг). В целом нормативные значения перекисного числа, установленные в Технических регламентах Таможенного союза Российской Федерации, строже стандартов Кодекса, за исключением только рыбных жиров.

Содержание вторичных продуктов окисления в России регулируется отдельными ГОСТами, которые устанавливают $AЧ \leq 3,0$ для премиум и высших сортов подсолнечного, соевого и рапсового масел. Содержание вторичных ненасыщенных альдегидов в рыбных жирах не должно превышать 20 (см. таблицу 1.3.1.3).

⁴ ГОСТ Р 53776-2010 «Масло пальмовое рафинированное дезодорированное для пищевой промышленности. Технические условия»

Таблица 1.3.1.3 Регулирование содержания вторичных продуктов окисления различных масел в России и за рубежом.

Нормативный документ	Продукт	Анизидиновое число, не более
ГОСТ 1129-2013	Подсолнечное масло рафинированное дезодорированное (премиум и высший сорт)	3,0
ГОСТ 31760-2012	Соевое масло рафинированное дезодорированное (высший сорт)	3,0
ГОСТ 31759-2012	Рапсовое рафинированное дезодорированное (высший сорт)	3,0
Стандарт Кодекса Алиментариус для рыбных жиров CXS329-2017	Рыбий жир, жир печени рыб, концентрированный рыбий жир и концентрированные этиловые эфиры рыбьего жира, кроме жиров рыб с высоким содержанием фосфолипидов	20

Также в Стандарте Кодекса Алиментариус для рыбных жиров CXS329-2017 присутствует число ТОТОХ, характеризующее общую степень окисления масла. Этот норматив не допускает к реализации жиры с одновременно высоким содержанием первичных (ПЧ) и вторичных (АЧ) продуктов окисления. ТОТОХ устанавливают ниже суммы индивидуальных возможных максимально допустимых значений перекисного и анизидинового чисел. Для рыбных и рыбьих жиров и этиловых эфиров рыбьего жира $АЧ \leq 26$ за исключением жиров рыб с высоким содержанием фосфолипидов [82].

1.3.2. Нормативное регулирование содержания 3-МХПД и глицидола.

Часть текста настоящего подраздела была опубликована в [11].

«Наличие различного рода токсических, мутагенных и канцерогенных эффектов 3- и 2-МХПД, их эфиров, глицидола и ГЭ обусловило принятие Научной группой по определению примесей в пищевых продуктах (CONTAM) Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA) заключения о рисках для здоровья человека, связанных с наличием этих контаминантов в пищевых продуктах [99]. Высокая канцерогенность глицидола (группа 2А) и ГЭ обусловила принятие максимально допустимого уровня присутствия ГЭ в жирах и растительных маслах, а также в смесях и продуктах специального медицинского назначения для детского питания (Приложение к Регламенту (ЕС) №1881/2006 от 26.02.2018) [71]». Эти нормативы в части продуктов детского питания впоследствии были пересмотрены в сторону снижения. Кроме того, с 1 января 2020 года в силу вступил новый норматив, касающийся содержания эфиров 3-монохлорпропандиола в пересчёте на свободный 3-МХПД. В действующем виде все указанные нормативы приведены в Приложении к Регламенту (ЕС) № 2020/1322 от 23.09.2020 (новая версия устаревшего регламента ЕС №1881/2006) в секции эфиров 3-монохлорпроан-1,2-диола (3-МХПД) и глицидола с жирными кислотами [72] и представлены в таблице 1.3.2.1:

Таблица 1.3.2.1 Максимально допустимое содержание эфиров монохлорпропандиолов и глицидола в пересчёте на свободные 3-МХПД и глицидол в различных пищевых продуктах, мкг/кг

		3-МХПД	Глицидол
1	Гидролизованный растительный белок	20	-
2	Соевый соус	20	-
3	Растительные масла и жиры, рыбий жир и масла других морских организмов, размещаемые на рынке для конечного потребителя или для использования в качестве ингредиента в пищевых продуктах, за исключением пищевых продуктов, указанных в пункте 4, и оливковых масел первого отжима:		
3.1	- масла и жиры из кокосового ореха, кукурузы, рапса, подсолнечника, сои, пальмовых ядер и оливкового масла (в составе рафинированного оливкового масла и оливкового масла) и смеси масел и жиров с маслами и жирами только этой категории	1250 ¹	1000 ²
3.2	- другие растительные масла (включая отжимные оливкового масла, рыбы жиры и масла других морских организмов и смеси масел и жиров с маслами и жирами только этой категории	2500 ¹	
3.3	- смеси масел и жиров из двух вышеупомянутых категорий	до 2500 ¹	
4	Растительные масла и жиры, рыбий жир и масла других морских организмов, предназначенные для производства детского питания и продуктов на основе обработанных злаков для младенцев и детей раннего возраста	750 ¹	500 ²
5	Начальные и последующие смеси и продукты специального медицинского назначения для детей грудного и раннего возраста (сухие)	125 ¹³	50 ²
6	Начальные и последующие смеси и продукты специального медицинского назначения для детей грудного и раннего возраста (жидкие)	15 ¹³	6,0 ²

¹ Норматив для всех масел, жиров и детского питания в части содержания эфиров 3-МХПД в пересчёте на свободный 3-МХПД вступил в силу 1.01.2021

² Норматив для рыбьих жиров, жиров морских организмов и детского питания вступил в силу 1.01.2021.

³ Норматив подлежит пересмотру в сторону понижения в течение 2-х лет с момента вступления в силу.

Нормативы содержания эфиров 3-монохлорпропандиола в пересчёте на свободный 3-МХПД в маслах, жирах и детском питании, а также нормативы содержания глицидиловых эфиров в пересчёте на глицидол в рыбьих жирах вступили в действие в Европейском союзе 1 января 2021 года. Предыдущий вариант требований Приложения к Регламенту (ЕС) (№1881/2006 от 26.02.2018) в части содержания 3-монохлорпропандиола и глицидола был внесён в Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 6 августа 2019 г. №132.

1.4. Методы исследований

1.4.1. Изучение окислительной деградации пищевых растительных масел

Химические методы анализа.

Перекисное число. В мировой практике одним из самых универсальных методов оценки первичных продуктов окисления масел является перекисное (пероксидное) число (ПЧ) [340]. Наиболее распространённый способ определения ПЧ в неокрашенных пищевых растительных маслах основан на восстановлении йодид-ионов ($2I^-$) до молекулярного йода (I_2) имеющимся в молекуле пероксида жирной кислоты кислородом (O_2^{2-}), взаимодействии молекулярного йода (I_2) с крахмальным индикатором, образования окрашенного комплекса и обесцвечивания этого комплекса путём титрования раствора тиосульфатом натрия известной концентрации. Перекисное число считают по количеству мл потраченного на обесцвечивание титранта [7].

Определение ПЧ в слабо окисляющихся животных жирах методом йодометрического титрования является недостаточно чувствительным. Поэтому используют фотоколориметрический (спектрофотометрический) способ определения ПЧ, а именно измерение интенсивности окрашенных комплексов роданистого аммония с железом (III), которое возникает при окислении ионов железа (II) перекисями [7, 133].

Альтернативные методы определения перекисного числа включают спектроскопию комбинационного рассеяния в купе с методом главных компонент [160], дериватизацию гидропероксидов трифенилфосфином и их определение методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье (ИКФ) [260], ИКФ нарушенного полного внутреннего отражения в сочетании с хемометрическими методами [63], ЯМР-спектроскопию [205], ВЭЖХ-МС/МС [153] и другие, из которых наиболее перспективной заменой традиционному титриметрическому методу считаются метод ИКФ и спектроскопия в ближней ИК-области [340].

Не смотря на широкую мировую распространённость данного метода провести оценку его точности нельзя по ряду причин, основными из которых является способность йодида окисляться в присутствии кислорода на свету, а также нестабильность пероксидов как таковых [296]. Они легко образуются и/или разлагаются во время предварительной обработки и анализа проб. Это может привести к переоценке или недооценке их относительного содержания [83].

Поэтому результат анализа ПЧ масел варьируется в зависимости от процедуры определения, условий окружающей среды, навески масла, точности соблюдения времени реакции и проч. Кроме того, некоторые соединения непероксидной природы в маслах также могут взаимодействовать с молекулярным йодом внося значительную погрешность

в результат определения. К таким соединениям относится, например, коэнзим Q10, который может содержаться в маслах как природно, так и вноситься при производстве некоторых масел или БАДов на их основе в качестве обогатителя или биологически активного вещества [253]. Также определению содержания перекисей масел могут мешать добавленные растительные экстракты, например лимона и мяты [275]. С другой стороны, титриметрический метод не позволяет оценить содержание циклических пероксидов [296] и проводить определение в маслах с высоким содержанием каротиноидов, которые затрудняют визуальную индикацию конечной точки [135]

Поскольку пероксиды сами по себе токсичными не являются (см. п.1.2.1), обычно определение перекисного числа проводят для оценки качества пищевых масел, а именно его вкусовых характеристик, поскольку высокие значения ПЧ (30-40 мэкв. акт. О/кг) связаны с ощущением прогорклости во рту [115]. Тем не менее, в России этот показатель внесён в перечень показателей безопасности масел и жирового компонента некоторых продуктов (см. п.1.3.1).

Анизидиновое число (АЧ) отражает количество вторичных продуктов окисления – продуктов разложения пероксидов и гидропероксидов, главным образом летучих и нелетучих моно- и диненасыщенных альдегидов [115]. Принцип определения АЧ основан на взаимодействии пара-анизидина с двойными связями альдегидов с образованием окрашенного комплекса, причём интенсивность тем сильнее, чем выше ненасыщенность альдегидов [3]. Анизидиновое число определяют по интенсивности поглощения комплекса пара-анизидина с альдегидами на длине волны 310 нм. В целом этот показатель также, как и перекисное число, может отражать характерную прогорклость сильноокисленного масла [41].

Аналогично перекисному числу, измерение анизидинового числа затруднено в окрашенных маслах [149], в присутствии некоторых веществ природного происхождения или добавленных при производстве [275], а также если имеет место реакция присоединения Михаэля [347]. Эффект последней, по мнению авторов этой работы, может быть компенсирован при дополнительном измерении насыщенных альдегидов.

У метода АЧ есть несколько ограничений. Во-первых, интенсивность поглощения зависит от уровня ненасыщенности альдегидов, что, в частности, может вызвать завышенную оценку АЧ, измеренного для масел, богатых ЕРА и ДНА. Во-вторых, пара-анизидин реагирует со всеми видами присутствующих альдегидов и, следовательно, не является селективным по отношению к альдегидам, возникающим в результате окисления липидов [43]. Таким образом, остро необходима разработка метода анализа окислительной стабильности [83].

Тиобарбитуровое число также используют для определения количества альдегидов, а точнее соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, в т.ч. алкеналей, алкадиеналей и малонового диальдегида, который образуется на ранних стадиях окисления жирных кислот с 3 и более двойными связями [41]. В отличие от АЧ, этот метод позволяет проводить измерение в пищевых продуктах без предварительной экстракции масла [43], хотя с экстракцией определение более точное и воспроизводимое [41]. Присутствие нехарактерных для масла компонентов, например экстрактов лимонника и мяты [275], белков, сахарозы, пиридинов и пиримидинов [41], может затруднять определение тиобарбитурового числа. В целом метод имеет низкую специфичность и может быть заменён методами ВЭЖХ [33, 77] или ГХ-МС [78] для определения конкретных соединений, например малонового диальдегида.

Спектроскопические методы анализа.

Метод инфракрасной спектроскопии относится к неразрушающим, быстрым и относительно простым методам анализа [179], который позволяет одновременно регистрировать сигналы всех компонентов масляного образца, включая первичные и вторичные продукты окисления [14] (рис. 1.4.1.1).

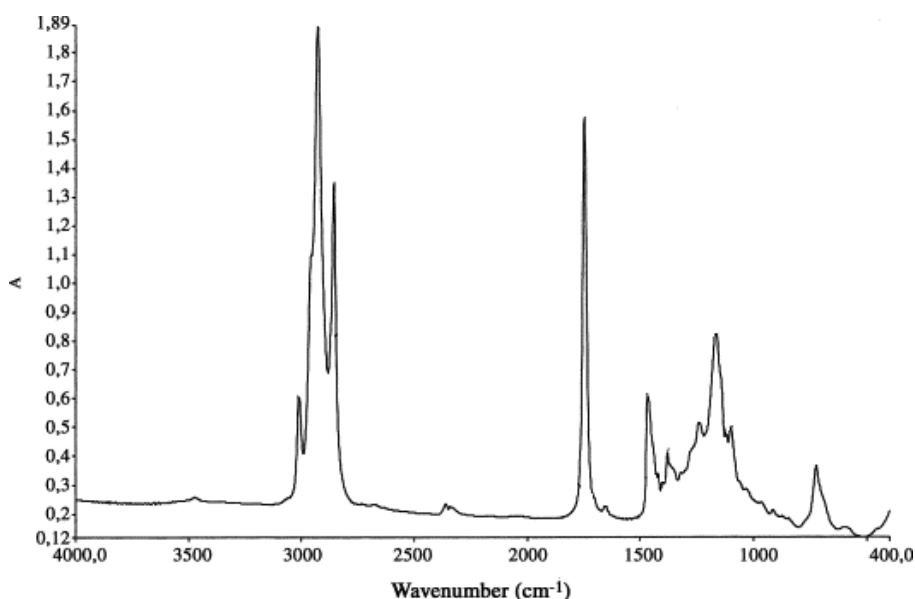


Рис. 1.4.1.1 Общий вид ИК-спектрограммы кукурузного масла и направления возможных сдвигов и изменений интенсивности характерных полос в процессе окисления при 25 °С [14].

Было установлено, что эти вещества могут иметь следующие характеристичные полосы поглощения [121]

при 3450 см^{-1} (связь при группе (-ОН), предположительно гидропероксиды и свободные жирные кислоты)

при 3535 см^{-1} (связь при группе (-ОН), предположительно спирты и вторичные продукты окисления с (ОН)-группой)

при 2730 см^{-1} и 2678 см^{-1} (связь при группе (-CO), предположительно альдегиды или димеры карбоновых кислот)

при 1728 см^{-1} и 1711 см^{-1} (связь при сложноэфирной группе (-COO), предположительно насыщенные альдегиды и ненасыщенные кетоны)

при 1685 см^{-1} - 1630 см^{-1} (предположительно насыщенные и ненасыщенные альдегиды, включая α,β -ненасыщенные альдегиды, кетоны, ненасыщенные карбонильные соединения)

при 976 см^{-1} (изолированная транс, транс- двойная (-C=CH-) связь предположительно альдегидов и кетонов).

Таким образом с помощью ИК-спектроскопии возможно определять динамику накопления гидропероксидов, спиртов, альдегидов и кетонов [295], общую степень окисления масел [36], содержание полярных компонентов [36, 293]

Помимо собственно спектральной информации, характеризующей распределение функциональных групп конкретного образца, ИК-спектроскопия позволяет проводить расчёт некоторых общепринятых показателей окисленности масел [179] и получаемые результаты хорошо коррелируют с данными, получаемыми стандартными методами (рис.1.4.1.2).

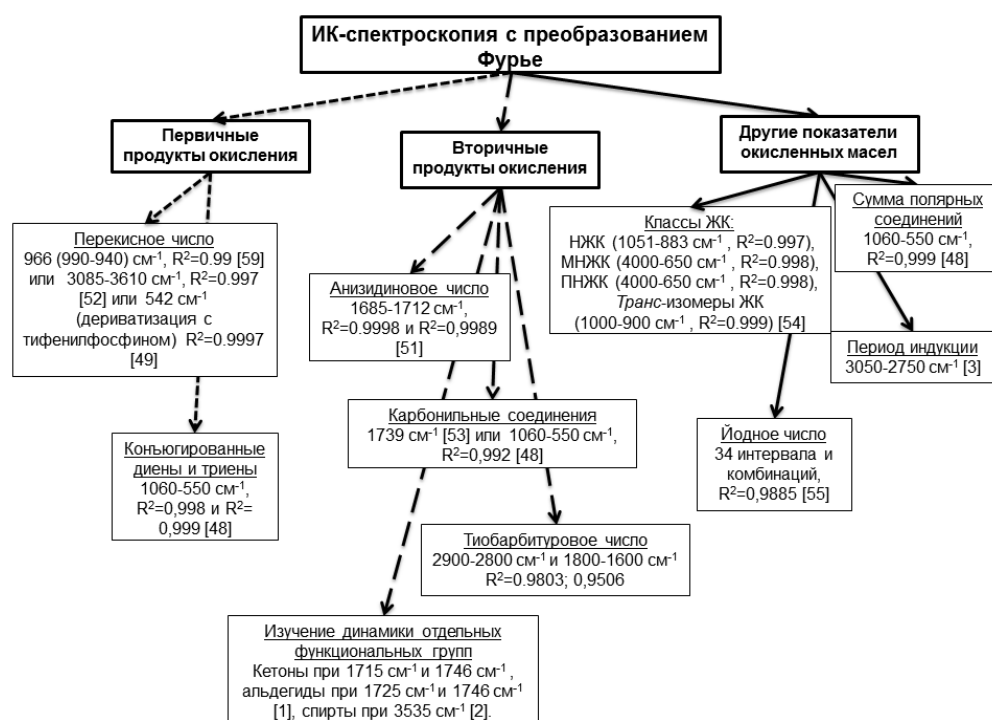


Рис.1.4.1.2 Классификация способов применения метода инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье для анализа окислительных изменений пищевых масел [14].

К таким показателям относятся, в частности, перекисное [63], анизидиновое, тиобарбитуровое и карбонильное [293] числа, конъюгированные диены и триены [293], а также период индукции [261]. Для этого, однако, необходимо проведение

предварительных исследований чтобы выяснить характеристичные длину волны (волновое число) и/или регион [180], поэтому такие исследования проводят чаще всего с использованием хемометрических инструментов [293, 319]. При этом основные изменяющиеся компоненты спектра объединяются в группы на основе схожего признака - в т.н. главные компоненты, – которые, в отличие от первоначальных спектральных данных, уже могут использоваться для извлечения количественной информации об интересующей группе веществ [14, 215].

Несмотря на описанные преимущества, метод ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье более пригоден для анализа пищевых масел высокой степени окисления, поскольку является недостаточно чувствительным для регистрации минорных компонентов [122, 324]

Аналогично ИК-спектроскопии метод ядерного магнитного резонанса на протонах (^1H ЯМР) также позволяет исследовать окислительные изменения пищевых масел быстро и без специальной подготовки и очистки проб [325, 125] (рис.1.4.1.3).

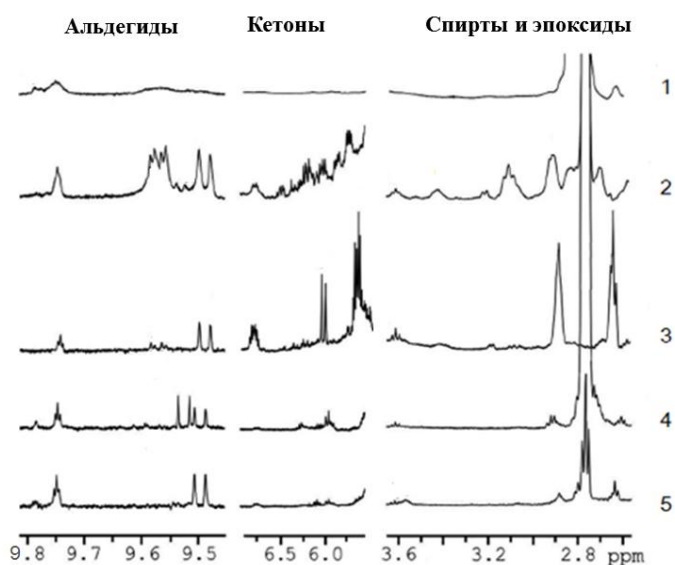


Рис. 1.4.1.3 Сравнение ^1H ЯМР-спектров вторичных продуктов окисления некоторых масел и жиров: 1 – экстрагированный жир лосося, окисленный при 50 °С 768 ч, 2 – подсолнечное масло, окисленное при 70 °С 216 ч, 3 – оливковое масло первого отжима, окисленное при 70°С 1560 ч, 4 – подсолнечное масло, окисленное при 190 °С 32,5 ч, 5 – оливковое масло первого отжима, окисленное при 190 °С 32,5 ч. [14]

Регистрация окислительных изменений с помощью ^1H ЯМР может проходить следующим образом (текст далее частично опубликован в [14]). «На начальных этапах окисления уменьшается интенсивность аллильных, бисаллильных и олефиновых протонов в цепях ненасыщенных жирных кислот (ЖК) (табл.1: F, I-J' и M соответственно, рис.1), в спектре появляются сигналы функциональных групп первичных продуктов окисления – гидропероксидов и гидроксидов с системами конъюгированных двойных связей различных конформаций [196]. При низкотемпературном окислении сначала

регистрируются сигналы соединений с *цис*-, *транс*-сопряженными двойными связями и группой –ООН на 6,58, 6,00, 5,56, 5,51 м.д. или –ОН на 6,45, 5,94, 5,64, 5,40 м.д. Затем они исчезают и появляются сигналы на 6,27, 6,06, 5,76, 5,47 м.д., относящиеся к *транс*-, *транс*-сопряженным двойным связям. Это может свидетельствовать об изменении их конфигурации на энергетически более выгодную [278]. Позднее (при высокотемпературной обработке масла практически сразу) на спектрах появляются сигналы функциональных групп, относящихся ко вторичным продуктам окисления: альдегидам (9,79-9,49 м.д.), кетонам (8,10-6,08 м.д.), спиртам (3,62-3,43 м.д.) и эпоксидам (3,10-2,63 м.д.) [278, 330]». Таким образом, возможно моделирование эволюции процессов окисления масел [125, 74].

Отдельно стоит отметить возможность применения спектроскопии ^1H ЯМР при уточнении структуры известных продуктов окисления и определении структуры новых. Так, было показано, что вторичные продукты окисления, такие, как например α , β -ненасыщенные альдегиды, могут иметь сопряжённые двойные связи и/или гидропероксигруппы, которые считаются характерными для первичных продуктов окисления [34]. Недавно методом ^1H ЯМР были обнаружены новые продукты окисления, имеющие более одной функциональной группы: дигидро-перокси-неконъюгированные диены, гидроперокси-эпокси-моноены, гидрокси-эпокси-моноены, кето-эпокси-моноены, гидрокси-кето-моноены, кето-гидрокси-эпокси-структуры, транс-эпоксимonoены [33], а также определена возможная структура продуктов окисления растительных стеринов [310].

Ещё одно преимущество метода ^1H ЯМР заключается в возможности проводить количественный расчёт с использованием сигналов самого исследуемого образца, например глицеридных групп на 4,303-4,139 м.д. [196, 197]. На основе этого принципа были разработаны методы количественного ^1H ЯМР-определения гидропероксидов [205, 281], альдегидов [205, 279, 70, 132], эпоксидов [325]. Тем не менее, анализ начальных этапов окисления пищевых масел без специальной очистки образцов обычно затруднён из-за неподходящей чувствительности ^1H ЯМР для анализа следовых количеств продуктов окисления [324, 325, 129]. При исследовании сильноокисленных масел обычно таких трудностей не возникает [145].

Таким образом, ^1H ЯМР-спектроскопия может стать надёжным альтернативным методом анализа пищевых масел [144, 334]. Тем не менее, пока метод не получил широкого распространения в анализе окислительной дегградации пищевых масел, ввиду меньшей распространённости ^1H ЯМР-спектрометров [195], а также меньшей

чувствительности по сравнению с хроматографическими [324] и химическими методами [129], особенно для анализа начальных этапов окисления [14, 324].

Газохроматографические методы анализа.

В процессе термического окисления масел образуются различные низко- и среднемолекулярные вещества — альдегиды, кетоны, спирты, гидрокси- и эпокси-производные жирных кислот, производные стероидов. Эти вещества относятся к минорным компонентам масел, поэтому одним из наиболее подходящих методов их анализа является газовая хроматография с различными детекторами [323]. Принципиально, все ГХ-методы можно разделить на методы с использованием предварительной дериватизации и без неё.

Газохроматографические методы с предварительной дериватизацией используют для изучения низкомолекулярных и/или нестабильных продуктов окисления, таких как, например, эпокси- и гидроксигирные кислоты [323], в т.ч. для определения местоположения кислородсодержащих групп в цепи ЖК [324], а также для определения С3-С5 альдегидов [78]. В последней работе эти вещества дериватизировали 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ), экстрагировали газодиффузионной микроэкстракцией в сочетании с дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракцией и анализировали методом ГХ-МС. Сообщается также о применении пентафенилгидразина (ПФГ) в качестве дериватирующего агента, поскольку летучесть ПФГ-производных выше, чем ДНФГ-производных [168].

Вообще гидразины достаточно часто используют в качестве дериватирующего агента при анализе продуктов перекисного окисления липидов методами ЖХ-МС и ГХ с масс-(МСД), электронно-захватным (ЭЗД) или пламенно-ионизационным (ПИД) детекторами [168]. Производные гидразинов обладают большим молекулярным весом и стабильностью [306], а ионизация в ячейке соударения МСД проходит эффективнее [168].

Для дериватизации гидроксигрупп также можно использовать тетраметилсилан (ТМС) [323]. Таким образом были выделены и определены методом ГХ-МС/ПИД эпокси-октадеканоат/-октадецеиноат и гидрокси-октадеканоат/-октадецеиноат /-октадекадиеноат в подсолнечном масле, а также производные гидроксигирных кислот масла канолы, такие как 8-, 9-, 10- и 11-гидроксиоктадецеиновая кислота (ОН-С18:1) и 9- и 13-гидроксиоктадекадиеновая кислота (ОН-С18:2) [322]. Определение моноэпоксидов жирных кислот также возможно путём метилирования жирных кислот с последующей дериватизацией моноэпоксидов ЖК диазометаном. Так были количественно определены транс-9,10- и цис-9,10-эпоксистеараты и транс-12,13-, транс-9, 10-, цис-12,13- и цис-9,10-эпоксиолеат, которые образовались из олеиновой и линолевой кислот оливкового и подсолнечного масел соответственно при обработке их температурой 180 °С в течение 15

часов [303]. Разделение целевых соединений или их очистку от мешающих компонентов, в том числе от неоксигенированных жирных кислот, можно проводить с использованием трёхступенчатой твердофазной экстракции [323, 214], адсорбционной [303] или двумерной хроматографии [324].

Легколетучие продукты начальных этапов окисления масел и жиров, такие как альдегиды, кетоны, спирты, обычно не представляют серьёзной опасности для здоровья человека [], а являются ключевыми веществами, которые составляют ароматный профиль исследуемого образца [156, 328]. На более поздних этапах окисления происходит накопление вторичных продуктов окисления, а также образование новых, в том числе окисленных α -, β -ненасыщенных альдегидов ($O\alpha$ -, β -НА), которые не только обуславливают аромат прогорклости, но и являются токсичными [118, 49]. Благодаря небольшой молекулярной массе эти вещества могут быть проанализированы газохроматографическими методами без дериватизации. К возможным способам экстракции этих веществ относятся статическая и динамическая парофазные экстракции (Static and Dynamic Headspace, ПФЭ), а также твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ), которая включает ТФМЭ прямого погружения (Direct Immersion, ПП-ТФМЭ), хэдспейс (Headspace, ПФ-ТФМЭ) и ТФМЭ с мембранным покрытием (Membrane Protected, МП-ТФМЭ) [13].

Сущность метода парофазной экстракции заключается в выделении паров образца при помощи нагревания или высаливания. Статическая ПФЭ реализуется в герметично закрытой ёмкости, тогда как динамическая ПФЭ – путём пропускания инертного газа (барботирования) через образец, который захватывает летучие компоненты. Эти компоненты затем концентрируются, например на твёрдом адсорбенте, а затем термически десорбируются в инжекторе газового хроматографа. На основе статической ПФЭ был разработан метод быстрого хэдспейс-ГХ-МС анализа содержания гексаналя, как ключевого составляющего прогорклого запаха [156]. Аналог динамической ПФЭ с применением сорбирующей смолы был использован авторами [241] для одновременного ГХ-анализа летучих веществ подсолнечного масла методами с МС- и ПИД-детектированием. Таким образом были идентифицированы кислоты, спирты, алканы, альдегиды, кетоны и фураны.

Метод ТФМЭ является техникой неисчерпывающего экстрагирования и основан на распределении компонентов смеси между матрицей, пространством над образцом и стационарной фазой [269,13]. Для скорейшего достижения равновесия чаще всего используют подогрев и перемешивание образца, но также могут применять высаливание или пониженное давление совместно с нагреванием для быстро окисляющихся

соединений [244]. Очень важно правильно подобрать ТФМЭ-волокно, стационарная фаза которого определяется типом(-ами) целевых аналитов и матрицы образца. Так, ПП-ТФМЭ используется для анализа нелетучих компонентов простых матриц, ПФ-ТФМЭ для анализа легко летучих соединений в комплексных матрицах, МП-ТФМЭ для нелетучих компонентов комплексных матриц [247,13] (рис. 1.4.1.4).

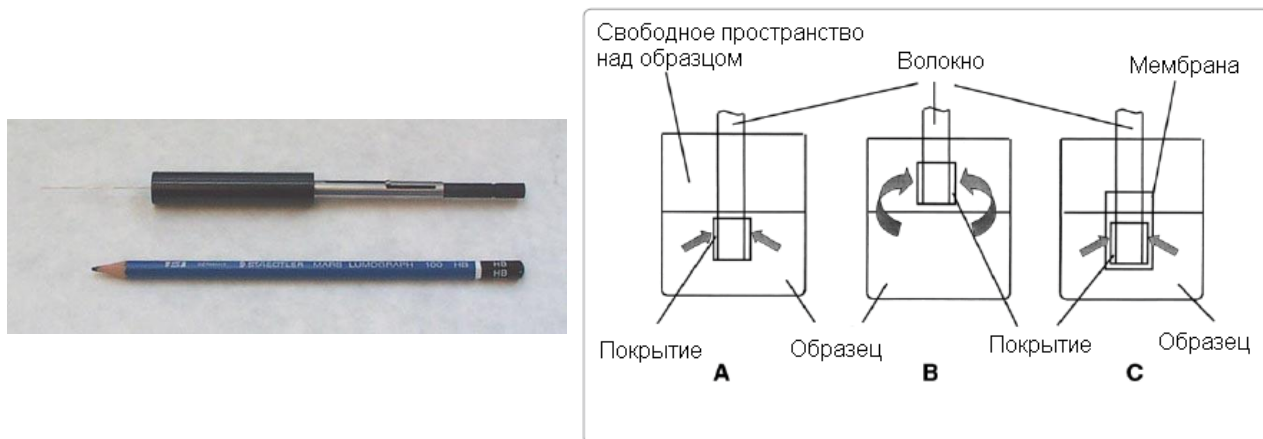


Рис. 1.4.1.4 Слева: общий вид шприца для ТФМЭ. Слева: различные виды ТФМЭ. А - ТФМЭ прямого погружения, В – хэдспейс-ТФМЭ, С - ТФМЭ с мембранным покрытием.

Инструментом ТФМЭ является активная полимерная фаза (волокно), которая нанесена на специальную основу и расположена внутри аналитического шприца. В процессе ТФМЭ-анализа волокно помещают в нужную фазу образца (паровую фазу над образцом или непосредственно в образец, если он жидкий), экспонируют волокно до достижения равновесия между исследуемой фазой и стационарной фазой волокна, а затем проводят термодесорбцию аналитов в инжекторе газового хроматографа с одновременной подачей газа-носителя в колонку (рис. 1.4.1.5).

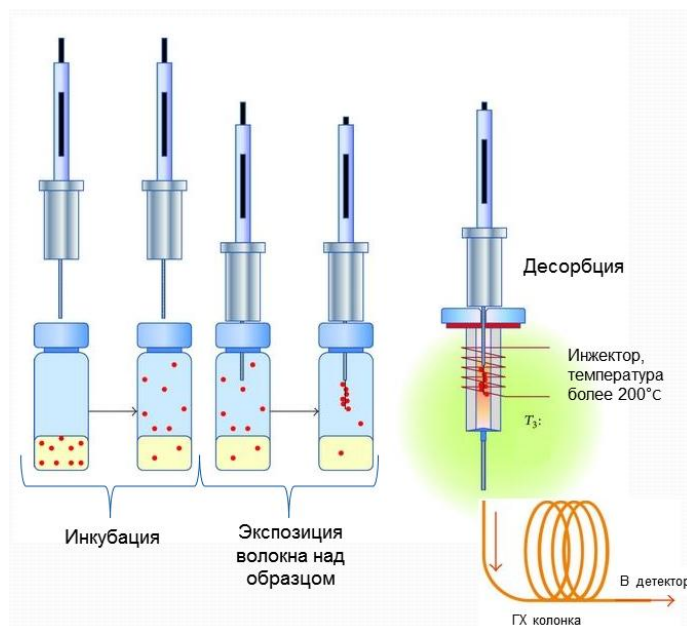


Рис. 1.4.1.5 Схематичное изображение ПФ-ТФМЭ-ГХ анализа

ПФ-ТФМЭ с ГХ-МС используют обычно для общего анализа ароматического профиля или его изменений в процессе термической обработки пищевых масел [184], а в сочетании с методом главных компонент этот метод позволяет установить источник летучих продуктов окисления – соответствующую жирную кислоту [310]. Так было обнаружено, что (Е)-2-пентеналь, (Е)-2-бутеналь, этилфуран, 4-гидроксиноненаль, бензальдегиды, (Е, Z)-2,4-гептадиеналь и (Е, Е)-2,4-гептадиеналь были связаны с α -линоленовой кислотой, (Е)-2-гексеналь, (Е, Е)-2,4-декадиеналь, (Е, Z)-2,4-декадиеналь и пентилфуран коррелировали с линолевой кислотой, а (Е)-2-ноненаль, октаналь, (Е)-2-деценаль и (Е)-2-ундеценал — с олеиновой кислотой.

Для экстракции аналитов методом ПП-ТФМЭ обычно требуется специальное устойчивое к воздействию образца волокно. При исследовании масляных образцов также необходимо принимать во внимание ряд сложностей, связанных частой заменой волокна, чисткой или заменой колонки, а также чисткой источника ионизации масс-детектора, поскольку предполагается, что аналиты (в т.ч. нелетучие триглицериды) десорбируют непосредственно в инжектор газового хроматографа. Тем не менее, именно метод ПП-ТФМЭ с ГХ-МС позволил наравне с летучими продуктами окисления и О α β -НА идентифицировать токолы, стеролы, сквален, циклические дипептиды и продукты их окисления в кукурузном масле, которые играют важную роль в процессе окисления [32]. Некоторые из обнаруженных соединений, такие как 3,7,11-триметил-3-додеканол и 4,8,12,16-тетраметилгептадекан-4-олид, были идентифицированы впервые и предложены в качестве новых маркеров окисления кукурузного масла. Кроме того, такой подход позволил установить более высокое содержание токолов и стеролов в рафинированном соевом масле по сравнению со свежим и, соответственно, объяснить меньшую окислительную стабильность последнего [198]. Примечательно, что одновременно с продуктами окисления метод позволяет регистрировать присутствие глицидиловых эфиров [32].

С помощью волокна Carboxack Z/PDMS был разработан быстрый и чувствительный неколичественный ГХ-МС метод определения полициклических ароматических углеводородов в маслах [256].

Жидкостнохроматографические методы анализа.

На сегодняшний день методы жидкостной хроматографии нашли широкое применение в изучении процессов окисления липидов. Разнообразие существующих ВЭЖХ-колонок и детекторов позволяет разделять, идентифицировать и количественно определять в том числе такие классы соединений, как гидрокси-, гидроперокси-, эпокси- и кето-производные свободных жирных кислот, их метиловых эфиров и/или целых

триглицеридов, окисленные производные токоферолов, а также летучие вторичные продукты окисления масел включая низкомолекулярные и фенольные производные (см таблицу 1.4.1.1).

Таблица 1.4.1.1 Возможности применения жидкостной хроматографии в анализе продуктов окисления липидов.

Определяемые вещества	Матрица	Метод	Тип стационарной фазы	Дериватизация	Детектор	LOD	LOQ	Источник
Малоновый диальдегид	Растительные масла	Газодиффузионная микроэкстракция с ВЭЖХ	Обращенная	Тиобарбитуровая кислота	УФ-(310 нм) и флуоресцентный (525 и 560 нм) детекторы	0,35; 0,25 мкг/г	1,0; 0,8 мкг/г	[77]
Малоновый диальдегид, транс, транс-2,4-гексадиеналь и транс, транс-2,4-нонадиеналь	?	ВЭЖХ	Обращенная	Тиобарбитуровая кислота	Флуоресцентный (532 нм) детектор и МСД с электроспреем	0,17; 19,70; 24,0 мкг/мл	0,57; 65,67; 80,0 мкг/мл	[204]
Малоновый диальдегид, 4-гидрокси-2-гексеналь, 4-гидрокси-2-ноненаль	Растительные масла после фритюрной обработки	ВЭЖХ	Обращенная	2,4-ДНФГ	Диодная матрица	0,021; 0,009; 0,014 мкг/мл	0,02; 0,02; 0,03 мкг/мл	[190]
Малоновый диальдегид, 4-гидрокси-2-гексеналь, 4-гидрокси-2-ноненаль, 2,4-декадиеналь	Растительные масла	ВЭЖХ	Обращенная	2,4-ДНФГ	МС/МС (положительная для МДА, отрицательная для остальных), MRM-режим	0,05; 0,14; 0,02; 0,12 мг/кг	0,15-7,5; 0,7-3,0; 0,06- 2,34; 1,54-9,0 мг/кг	[91]
Малоновый диальдегид, 4-гидрокси-2-гексеналь, 4-гидрокси-2-ноненаль	Пальмовое, кукурузное, рапсовое, камелии, льняное масла, а также МЭЖК	ВЭЖХ	Обращенная	2,4-ДНФГ	Диодная матрица (310 нм и 378 нм)	-	-	[189]
Ацетон, гексаналь, Е-2-гексеналь, октаналь, Е-2-октеналь, нонаналь, Е-2-ноненаль, Е, Е-2,4-нонадиеналь и Е, Е-2,4-декадиеналь	Оливковые масла первого отжима	УВЭЖХ	Обращенная	2,4-ДНФГ	Диодная матрица (360 нм)	1,6- 150,1 мкг/кг	4,8- 906,1 мкг/кг	[346]
20 альдегидов С2-С10 и 5 кетонов	Масло камелии	ВЭЖХ	Обращенная	2,4-ДНФГ	Диодная матрица (360 нм), МС/МС, электроспрей в режиме отрицательных ионов	-	-	[61]
Акролеин, кротоновый альдегид, пентаналь,	Кукурузное масло после фритюрной	ВЭЖХ	Обращенная	2,4-ДНФГ	МС/МС, электроспрей в	6-2000 нМ/л	3-630 нМ/л	[186]

транс-2-гексеналь, гексеналь, транс, транс-2,4-гептадиеналь, гептаналь, нонаналь, транс, транс-2,4-декадиеналь и 4-гидрокси-2-ноненаль	обработки и моллюски				режим отрицательных ионов, MRM-режим			
Фенольные соединения	Оливковые масла первого отжима после высокотемпературной обработки	ВЭЖХ	Обращенная	Без дериватизации	Диодная матрица (360 нм), микроToF (электроспрей)	-	-	[243]
Гидропероксиды C18:1МЭ и C18:2МЭ, Кетодиены, метил-цис-9,10-эпоксистеарат и метил-транс-9,10-эпоксистеарат	Подсолнечное ВО, ВЛ	ЖХ	Нормальная	Без дериватизации	Детектор по светорассеянию	2,5 мкг/мл 0,2 мг/г FAME	5,7 мкг/мл 0,4 мг/г FAME	[207]
Гидропероксидиены МЭ линолеата и линолената, кетодиены, гидроксидиены, гидропероксиды	Подсолнечное ВСО, ВО, ВЛ, соевое, рапсовое	ВЭЖХ	Нормальная	NaOMe в метаноле	УФ- и детектор по светорассеянию	-	-	[208]
Изомеры гидропероксида линолевой кислоты и этилового эфира линолевой кислоты	Ликер и крем для кожи	ВЭЖХ	Обращенная	Без дериватизации	microQTOF-Q II, ионизация в присутствии ионов натрия	-	-	[153]
Цис / трансизомеры гидропероксида линолевой кислоты	Растительные масла	ВЭЖХ	Хиральная	Без дериватизации	microQTOF-Q II, ионизация в присутствии ионов натрия, SRM-режим	-	-	[152]
Гидропероксиды, гидроксиды и кетоны линолевой и арахидоновой кислот	Смеси окисленных жирных кислот, плазма крови мышей	ВЭЖХ	Обращенная	Без дериватизации	МС/МС, электроспрей в режиме положительных ионов, MRM-режим	-	0,1 пМ/вкол	[28]
Стереоизомеры α-Тос гидропероксида (Тос-ООН) и токоферилхинон (ТQ)	Оливковое масло первого отжима, окисленное	ВЭЖХ	Нормальная	Без дериватизации	МС/МС, электроспрей	-	-	[294]
Снижение α-, γ-	Масло семян тыквы	ВЭЖХ	Обращенная	Щелочное	Диодная матрица	-	-	[231]

токоферолов и сквален	холодного отжима и масло из жареных тыквенных семечек			омыление (сквален)	(294 нм), флуоресцентный детектор (330 нм), УФ-детектор (сквален)			
Продукты деградации γ -Токоферол-5,6-хинон (токоред)	γ -Токоферол-5,6-хинон (токоред)	Сверхкритическая флюидная хроматография (UPLC2)	-	Без дериватизации	QTOF	-	-	[345]
Изомеры ТАГ2С18:1,С18:2-ООН	Изомеры ТАГ2С18:1,С18:2-ООН	ЖХ	Нормальная	Без дериватизации	МС/МС, электроспрей	-	-	[165]
Эпоксиды ТАГ	Масло семян камелии	ВЭЖХ	Обращенная	Без дериватизации	МС/МС, электроспрей	-	-	[336]
Моногидропероксидиены, кетодиены ТАГ	Трилинолеин, подсолнечное ВО, ВЛ	ВЭЖХ	Нормальная	Без дериватизации	Диодная матрица	0,03 мМ/кг масла	0,06 мМ/кг масла	[302]
Общее количество окисленных ТАГ	Масло семян тыквы	ВЭЖХ	Обращенная	Без дериватизации	Диодная матрица (210 нм)	-	-	[337]
Общее количество окисленных ТАГ для расчёта перекисного числа	Рафинированное пальмовое, фракционированное пальмовое, рапсовое, соевое, кукурузное, льняное, масло из рисовых отрубей и какао	ЖХ	Обращенная	Без дериватизации	Micro QTOF II	-	-	[134]

По сравнению с газовой хроматографией, методом ВЭЖХ можно анализировать меньшее количество летучих соединений и с более высоким пределом обнаружения, хотя разделение аналитов методом ВЭЖХ происходит эффективнее [61]. Так, использование специальных колонок [152] или приёмов ионизации в случае использования масс-спектрометрических детекторов [152, 153, 165] позволяет разделять позиционные и стереоизомеры [294] различных продуктов окисления, в том числе геометрические [165, 153]. Например, методом ВЭЖХ было проведено разделение изомеров гидропероксидов метиловых эфиров олеиновой и линолевой кислот, кетодиенов метиллинолеата, а также метил-цис-9,10-эпоксистеарата и метил-транс-9,10-эпоксистеарата [207]. Возможность разделения подобных изомеров позволяет изучать механизмы окисления масел [153, 152]: например, было обнаружено, что диолеоил-(10-гидроперокси-8E,12Z-октадекадиеноил) и диолеоил-(12-гидроперокси-9Z,13E-октадекадиеноил) характерны для фотоокисленного масла канолы, в то время как диолеоил-(9-гидроперокси-10E,12E-октадекадиеноил) и диолеоил-(13-гидроперокси-9E,11E-октадекадиеноил) для термоокисленного [165].

В отличие от ГХ-методов определения окисленных продуктов жиров, ВЭЖХ-анализ в большинстве случаев подразумевает определение конкретных соединений вместо скрининговых анализов. Поэтому перед разработкой метода нужно определить, какое именно соединение или группу требуется измерять, а затем найти соответствующие стандартные вещества [165]. К сожалению, такой подход часто является непростой задачей из-за большого разнообразия продуктов окисления масел и жиров. В некоторых случаях возможен анализ суммарного содержания определенной группы веществ, но в этом случае исследователь должен быть уверен, например, в отсутствии коэлюирования аналитов с другими соединениями, как произошло при определении группы гидроксидиенов в модели липидной системы [302]

Кроме летучих карбонильных веществ все продукты окисления липидов вполне могут анализироваться методом ВЭЖХ без дериватизации. Тем не менее, помимо анализа окисленных производных триглицеридов в нативном виде, в некоторых работах встречается исследование окисленных продуктов отдельных свободных жирных кислот (СЖК) [153] или их метиловых эфиров (МЭЖК) [207]. Такие жирные кислоты могут быть получены путём липазного [152] или химического [208] гидролиза масла или отдельных ТАГ (СЖК) с последующей метанольной дериватизацией (МЭЖК). Исследование окисления СЖК или МЭЖК упрощает идентификацию продуктов окисления конкретной кислоты [61]. При этом, однако, использование дериватизации жирных кислот, в том числе метанольной, может вызывать изменения в составе анализируемых соединений. Например, при таком способе дериватизации снижалось количество

гидропероксидиеновых групп и увеличивалось содержание кето- и гидроксидиенов ЖК [302, 152]

Анализ низкомолекулярных летучих карбонильных соединений методом ВЭЖХ требует использования какого-либо дериватирующего реагента для повышения чувствительности и стабильности анализа [168]. Чаще всего для этих целей используют 2,4-динитрофенилгидразин (ДНФГ), с применением которого были разработаны методы количественного определения малонового диальдегида (МДА), 4-гидрокси-2-гексенала (ГГЕ) и 4-гидрокси-2-ноненала (ГНЕ), 2,4-декадиенала [190, 91, 189]. Эти вещества являются одними из наиболее токсичных продуктов окисления масел (см. п. 1.2.1). ДНФГ также позволяет измерять и другие альдегиды и кетоны в пищевых маслах наравне с методом ТФМЭ-ГХ [346], среди которых могут быть, например, ацетон, гексеналь, Е-2-гексеналь, октаналь, Е-2-октеналь, нонаналь, Е-2-ноненаль, Е, Е-2,4-нонадиеналь и Е, Е-2,4-декадиеналь [346-186]. Для детектирования ДНФГ-производных обычно используют диодно-матричный или УФ- детекторы, как одни из наиболее распространённых и удобных в работе. К сожалению, их чувствительности не всегда хватает для определения низких количеств летучих веществ или летучих веществ с более чем двумя двойными связями [346, 168]. То же касается детектора по светорассеянию для анализа продуктов окисления метиловых эфиров жирных кислот [207]. Вместе с ними можно использовать масс-спектрометрический или тандемный масс-спектрометрический детекторы, которые позволяют значительно снизить предел обнаружения и количественного определения аналитов и таким образом работать со слабоокисленными маслами.

Жидкостнохроматографические методы также могут быть использованы в качестве усовершенствованной альтернативы стандартным методам, например тиобарбитуровому или перекисному числу. В отличие от этих показателей, ВЭЖХ позволяет определять конкретные соединения, например только малоновый диальдегид [77], группу определенных альдегидов, таких как МДА, транс, транс-2,4-гексадиеналь и транс, транс-2,4-нонадиеналь [204] или окисленных производных ТАГ [134]. Авторы первых двух работ в качестве дериватирующего реагента использовали тиобарбитуровую кислоту, а детектирование осуществляли с помощью УФ-, флуоресцентного и/или масс-детекторов. Для детектирования недериватизированных окисленных производных ТАГ авторы [134] использовали времяпролетный масс-детектор, а перекисное число определяли с помощью метода наименьших квадратов.

1.4.2. Определение сложных эфиров МХПД и глицидола

Часть текста настоящего подраздела была опубликована в [16, 12].

«Измерение количества эфиров монохлорпропандиолов и глицидиловых эфиров в пищевых маслах и жирах 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 (непрямое определение 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в форме 3-МБПД) [76, 338]. Для рутинного лабораторного анализа чаще применяют непрямое определение газохроматографическим методом. Он более универсален и требует меньше стандартных веществ [76], поскольку теоретически для прямого количественного анализа МХПДЭ и ГЭ требуются стандарты всех возможных вариантов соединений МХПД и глицидола с жирными кислотами, характерными для конкретного масла или жира.

Общепринятый способ непрямого определения заключается в отщеплении жирных кислот с образованием свободных 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола, преобразовании 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». Схематично такой принцип приведён на рисунке 1.4.2.1:

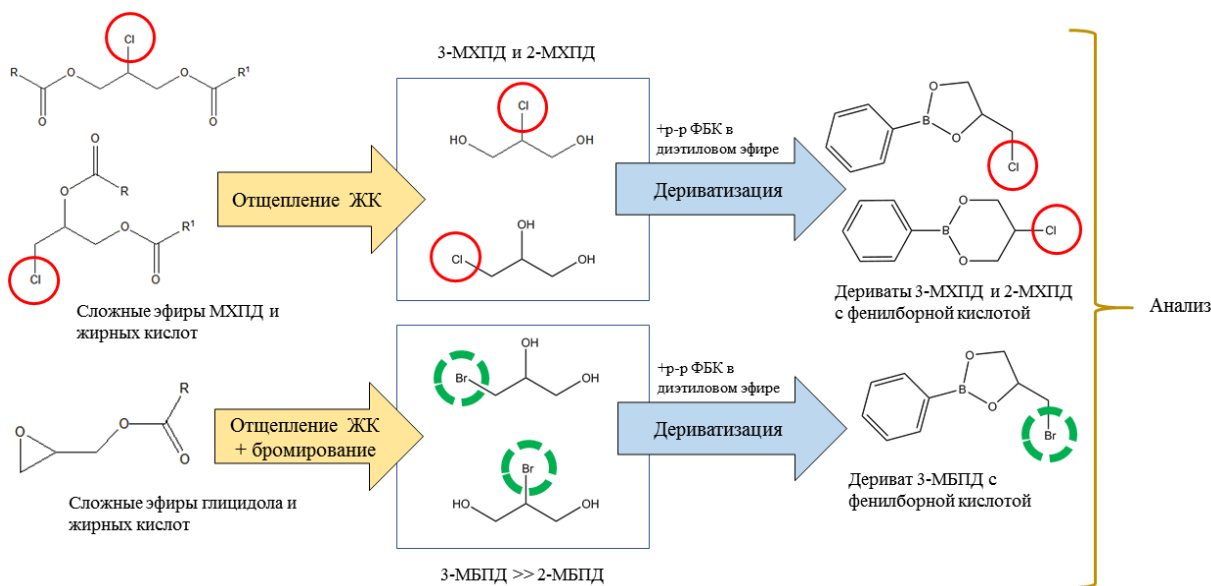


Рис. 1.4.2.1. Принцип определения суммарного содержания эфиров 3-монохлорпропандиола (3-МХПД), 2-монохлорпропандиола (2-МХПД) и глицидиловых эфиров в пищевых маслах и жирах (непрямой метод).

Введение нормирования предполагает наличие аттестованных методов анализа контролируемых соединений. Принципиально существующие аттестованные методы непрямого определения МХПДЭ и ГЭ отличаются способом отщепления жирных кислот и временем проведения этой реакции. По способу отщепления ЖК эти методы делятся на кислотные, щелочные и энзимные, а по времени реакции (отщепления ЖК) на быстрые и медленные (таблица 1.4.2.1):

Таблица 1.4.2.1. Сравнительная характеристика утверждённых не прямых методов определения эфиров 2-, 3-МХПД и глицидиловых эфиров в пересчёте на свободные 2-МХПД, 3-МХПД и глицидол.

Официальные документы	AOCS Cd29d-19	AOCS Cd29a-13 ISO 18363-3:2017	AOCS Cd29b-13 ISO 18363-2:2018	DGF C-VI 18 (10) AOCS Cd29c-13 ISO 18363-1:2015	ISO 18363-4:2021
Российские официальные документы (аналоги)	-	ГОСТ Р ИСО 18363-3-2020 (перевод ISO 18363-3:2017)	ГОСТ Р ИСО 18363-2-2020 (перевод ISO 18363-2:2018)	ГОСТ Р ИСО 18363-1-2020 (перевод ISO 18363-1:2015)	-
Краткая характеристика метода	Энзимный метод	Кислотный длительный метод	Щелочной длительный метод	Щелочной быстрый метод 1	Щелочной быстрый метод 2
Количество проб на 1 образец:	1	2 (А и Б)	2 (А и Б)	2 (А и Б)	1
Внутренние стандарты: 3-МХПД	3-МХПД 3-МХПД-d5 ³	(ЖК) ₂ -3-МХПД ¹ (ЖК) ₂ -3-МХПД-d5 ¹³	3-МХПД 3-МХПД-d5 ³ (ЖК) ₂ -3-МХПД ¹ (ЖК) ₂ -3-МХПД-d5 ¹³	3-МХПД (ЖК) ₂ -3-МХПД ¹ (ЖК) ₂ -3-МХПД-d5 ¹³	(ЖК) ₂ -3-МХПД ¹ (ЖК) ₂ -3-МХПД- ¹³ C ³
2-МХПД	2-МХПД 2-МХПД-d5 ³	(ЖК) ₂ -2-МХПД ¹	2-МХПД 2-МХПД-d5 ³ (ЖК) ₂ -2-МХПД ¹ (ЖК) ₂ -2-МХПД-d5 ¹³		(ЖК) ₂ -2-МХПД ¹
Глицидол	3-МБПД 3-МБПД-d5 ³	Г-(ЖК) ² Г-(ЖК) ² -d5 ³	Г-(ЖК) ² Г-(ЖК) ² -d5 ³	Г-(ЖК) ²	Г-(ЖК) ² Г-(ЖК) ² -d5 ³
Условия отщепления ЖК -Реагент для отщепления ЖК: -Температура: -Длительность действия реагента:	Липазы <i>Candida cylindracea</i> или <i>Candida rugosa</i> , 25 °С 30 мин	H ₂ SO ₄ 40 °С 16 часов	NaOH -22-25 °С 16 часов	NaOH или NaOMe комн. темп. 3,5-5,5 мин	NaOMe 10 °С 12 мин
Дополнительная подготовка образца	-	Промывание образца водой от солей хлора	-	-	-

Ориентировочное время полного анализа 1 образца включая разделение на ГХ, (без приготовления растворов)	1-2 часа	18-20 часов	18-20 часов	2-3 часа	1-2 часа
Форма глицидола	3-МБПД	3-МБПД	3-МБПД	3-МХПД	3-МБПД
Определение глицидола	Прямое (без использования коэффициента перехода эфиров в свободную форму)			По разнице содержания 3-МХПД в пробе А и Б	Прямое
Метод детектирования	МС	МС	МС	МС	МС/МС
Построение градуировочных прямых	да	да	рекомендуется	нет	да
Использование контрольной пробы	нет	нет	рекомендуется	да	да
Примерная полнота извлечения	?	~100% ⁵	~98-99% ⁵	~40-95% ⁶	100% (учёт полноты извлечения в контрольной пробе)
Обязательное специальное оборудование	-	-	Испаритель с программированием температуры, предколлонка	Испаритель с программированием температуры	ГХ, поддерживающий систему обратной продувки ⁴ , предколлонка
<p>¹ (ЖК)₂ — сложный эфир с двумя жирными кислотами, например дипальмитоил-, дистеарил- или другие.</p> <p>² (ЖК) — сложный эфир с жирной кислотой, например глицидил стеарат, пальмитат, олеат или другие.</p> <p>³ Меченые стандарты. d5 — стандарт, дейтерированный по 5 положениям, ¹³C3 — стандарт с углеродом с а.е.м. 13 по 3 положениям.</p> <p>⁴ «Backflush»</p> <p>⁵ [137, 138]</p> <p>⁶ [98]</p>					

Энзимный метод. Методика ферментной переэтерификации была утверждена сравнительно недавно (2019 год) уже после появления утверждённых на данный момент вариантов ISO 18363-1 [4], -2[5], -3[6]. Она основана на использовании липаз *Candida cylindracea* или *Candida rugosa*. Реакция протекает при комнатной температуре, а для исследования одного образца требуется всего одна проба, поэтому определение возможно за 1-2 часа. Это, однако, снижает точность анализа за счёт отсутствия возможности оценить наличие побочных реакций. Кроме того, в методике при расчёте содержания аналитов не учитывается коэффициент перехода эфиров в свободную форму и отсутствует упоминание об анализе контрольной пробы. При этом, однако, прописана необходимость построения градуировочных прямых. Основным недостатком метода можно считать ограниченность применения указанных липаз к МХПДЭ и ГЭ, содержащим длинноцепочечные жирные кислоты, такие как, например, ЭПК и ДГК. Поэтому, для анализа рыбьих жиров, нормирование которых, как было приведено выше, было введено с 1 января 2021 года, настоящая методика не может быть использована.

Длительный кислотный метод. В методике ISO 18363-3:2017 отщепление жирных кислот происходит под действием раствора серной кислоты в течение 16 часов. Теоретически кислые условия реакции могут стать катализатором трансформации нестабильного глицидола (и его эфиров с жирными кислотами) в более стабильный 3-МХПД (или его эфиры). Поэтому, в отличие от других методик здесь сначала осуществляют конвертацию эфиров глицидола в эфиры 3-монобромпропандиола, а затем проводят реакцию переэтерификации. Кроме того, рекомендовано промывать образцы масла водой от хлорсодержащих неорганических соединений. Хотя необходимость в такой процедуре может возникать не часто в рутинном анализе известных образцов (например, в производственных лабораториях), то, вероятно, при исследовании масел неизвестного состава эта процедура становится обязательной. Это может увеличивать трудоёмкость анализа. Использование этерифицированных стандартов снимает необходимость определения коэффициента конвертации эфиров в свободные формы, а построение градуировочных кривых повышает точность анализа. Однако в тексте методики не упоминается использование контрольной пробы. В целом, такой способ подготовки проб может успешнее применяться в производственных лабораториях для анализа образцов известного состава.

Длительный щелочной метод. В последнем варианте (ISO 18363-2:2018) методика подразумевает длительную щелочную переэтерификацию в морозильной камере в течение не менее 16 часов. Считается, что такие условия сводят к минимуму преобразование свободного 3-МХПД в глицидол, которое имеет место при проведении реакции при

комнатной температуре [8]. Для анализа одного образца необходимо использовать 2 пробы (А и Б) и 10 различных стандартов (в т.ч. 5 меченых) для контроля побочных реакций и повышения точности анализа. Кроме того, рекомендуется построение градуировочных прямых и ежедневный анализ контрольной пробы, хотя эти процедуры не прописаны. Методика требует использования испарителя с программированием температуры, а также предколони для предотвращения быстрого выхода из строя основной колонки. Данная методика по всей видимости является наиболее точной (кроме методики ISO 18363-4:2021 [151]), но и наиболее трудоёмкой и дорогостоящей из всех представленных.

Быстрый щелочной метод 1. Это одна из первых официально зарегистрированных методик из представленной группы. В последнем варианте (ISO 18363-1:2015) она предполагает использование быстрой щелочной переэтерификации (реакция длится несколько минут) и управляемую конвертацию глицидола в 3-МХПД в одной из проб (проба А). Таким образом методика рассчитана на прямое определение содержания 3-МХПД и определение содержания глицидола (в форме 3-МХПД) по разнице между пробой А и Б. Ранее было показано, что это может серьёзно снижать точность определения последнего, как и не строгое соблюдение времени на отщепление жирных кислот [172]. Кроме того, текст оригинальной методики не предполагает измерения содержания 2-МХПД, оценки побочной конвертации исследуемых аналитов друг в друга и степени высвобождения аналитов из связанных с жирными кислотами форм. Также в тексте отсутствует упоминание о необходимости построения градуировочных прямых, хотя получаемые результаты анализа могут быть скорректированы по результатам контрольной пробы. Помимо прочего, методика требует использования особого испарителя с программированием температуры. Тем не менее, применение автоматического робота подготовки проб и использование внутреннего стандарта для оценки содержания 2-МХПД может повысить точность и расширить область применения данной методики.

Быстрый щелочной метод 2. Это наиболее точная, лёгкая и универсальная в исполнении методика, которая представляет собой улучшенный вариант ISO 18363-1:2015 и ISO 18363-2:2018. Выполнение процедур может быть автоматизировано с помощью робота автоматической подготовки проб, что может повысить сходимость получаемых результатов и уменьшить нагрузку на оператора. Благодаря использованию углерод-меченного стандарта 1,2-дипальмитат-3-МХПД-¹³C3 количество проб на один образец сокращено до одной без потери возможности оценить побочную конвертацию 3-МХПД в глицидол. При этом содержание глицидола рассчитывается напрямую по содержанию 3-

МБПД-derivата с фенолборной кислотой. В методике используется принцип быстрой щелочной переэтерификации при пониженной температуре, имеется требование о построении градуировочных прямых; высокая точность результатов анализа достигается путём корректировки результатов по контрольной пробе. Однако, применение метода требует наличия газового хроматографа с возможностью обратной продувки колонки (backflush) и дополнительной предколонки для очистки пробы после введения в хроматограф. Кроме того, методика подразумевает использование тандемного масс-спектрометрического детектора, оснащённость которым исследовательских лабораторий обычно меньше, чем обычными масс-спектрометрическими детекторами. ISO 18363-4:2021 был введен в действие в августе 2021 года.

ВЫВОДЫ

Выбор методик оценки окислительной деградации пищевых растительных масел.

Согласно проведённому обзору литературы, немногие аналитические методы являются достаточно специфичными и чувствительными для исследования начальных этапов окисления масел и жиров. Для целей настоящего исследования было решено оценивать динамику окисления с помощью определения жирнокислотного состава (включая *цис*- и *транс*-изомеры), инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (ИКФ), перекисного числа для определения накопления первичных продуктов окисления, аниидинового числа для контроля возможного образования вторичных продуктов окисления, а также провести исследование летучих веществ методом твердофазной микроэкстракции с ГХ-ПИД/МС. Этот метод является достаточно чувствительным для анализа летучих соединений различной природы, в том числе альдегидов, спиртов, кетонов, углеводов и др., которые являются одними из основных продуктов деградации пищевых масел [13].

Выбор методики анализа эфиров монохлорпропандиолов и глицидиловых эфиров в пищевых маслах и жирах.

Часть текста настоящего подраздела была опубликована в [16].

На момент начала работы по определению технологических контаминантов эфиров монохлорпропандиолов и глицидиловых эфиров соискателем (начало 2019 года) официально действующими методами за рубежом являлись ISO 18363-1:2015, ISO 18363-3:2017, ISO 18363-2:2018 и их аналоги. В России не было зарегистрировано ни одного официального метода определения этих веществ, велась работа по созданию переводных межгосударственных стандартов ГОСТ Р ИСО. «Поэтому в целях расширения методической базы нами было принято решение разработать и аттестовать собственный

вариант определения содержания эфиров монохлорпропандиолов и глицидола в пищевых растительных маслах и жирах методом ГХ-МС/МС с предварительной длительной щелочной переэтерификацией.

За основу для разработки собственного метода нами был взят ISO 18363-3:2017 (щелочной гидролиз в течение 16 ч), поскольку согласно предварительно проведённому поиску литературы, он обладает рядом преимуществ над ISO 18363-1:2015 и ISO 18363-2:2018. Проведение анализа методом длительной щелочной переэтерификации позволяет избежать побочных реакций взаимопревращений аналитов, и частичного образования 3-МХПД из глицидола в кислой среде при наличии хлорсодержащих соединений в образце масла или погрешностей, связанных с неточным соблюдением времени переэтерификации [172]. Использование меченного стандарта глицидола (3-МБПД-d5) позволяет непосредственно измерять глицидол в пробе, вместо определения его по разнице в ISO 18363-1:2015. Однако, все описанные методы (включая ISO 18363-3:2017) для разделения и детектирования аналитов предлагают использовать газохроматографическую систему с моноквадрупольным масс-детектором, а количественный анализ выполнять без построения градуировочных прямых, что может снижать точность определения.»

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

2.1.1 Масла, жиры и масложировые продукты

Изучение процессов окисления проводили с использованием неочищенных (прессовых) и очищенных подсолнечных масел, произведённых на заводе в посёлке Алексеевка Воронежской области в период с 2017 по 2019 годы. На указанном заводе путём прямого отжима получали прессовое масло, которое затем нейтрализовали, отбеливали и последовательно дезодорировали несколько раз. Все манипуляции проводились на заводском лабораторном рафинаторе; режимы производства представлены в таблице 2.1.1.1. Все указанные процедуры проводились без участия соискателя⁵.

Таблица 2.1.1.1 – Условия производства рафинированного дезодорированного подсолнечного масла

Наименование процесса	Температура проведения, °С	Время проведения, мин	Дозировка активного вещества, г/кг
1)Прессование	75-110	-	-
2)Гидратация	-	-	-
2.1) Кислотное кондиционирование (внесение 30% раствора лимонной кислоты)	70-75	-	-
2.2) Нейтрализация (внесение 12-13% раствора NaOH)	70-75	-	-
2.3) Промывка водой	90-95	-	-
3)Прессование	90±5	75±5	-
3.1) Внесение 30% раствора лимонной кислоты	-	-	3
3.2) Внесение отбелной глины	-	-	3
4) Дезодорация	220±2	90±5	-

Сразу после каждого этапа очистки масло разливалось в фольгированные пакеты с замком и контролем вскрытия или в пластиковую тару с запаиванием крышки и в переносной морозильной камере доставлялось в лабораторию на следующий день после выработки. Упаковки масла хранились при -25 °С до начала проведения подготовки проб.

Полученные масла были пронумерованы следующим образом исходя из количества циклов очистки (таблица 2.1.1.2):

Таблица 2.1.1.2 – Последовательность очисток подсолнечных масел.

Обозначение образца	Количество рафинаций	Количество дезодораций
Прессовое	0	0

⁵ Соискатель благодарит компанию ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты» в лице начальника управления по нормативно-техническому регулированию и аудиту Передрий Натальи Викторовны за предоставление образцов подсолнечных масел, использованных для исследований в настоящей работе.

1P1Д	1	1
1P2Д	1	2
1P3Д	1	3
1P4Д	1	4

Изучение влияния различного количества дезодораций на химический состав и некоторые показатели окисленности проводили для подсолнечных масел указанных видов (таблица 2.1.1.2), которые были произведены в 2019 году. Перед началом работ пакет с каждым типом масла размораживали, содержимое переливали во флаконы тёмного стекла так, чтобы не оставалось свободного места под крышкой, закрывали крышками с септой и хранили в морозильной камере при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализа.

Изучение содержания технологических контаминантов проводили в различных видах масел и жиров, а также масложировых смесях на базе лаборатории химии пищевых продуктов ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» в период с 2019 по 2020 гг. Все образцы после поступления в лабораторию хранились при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализа. Всего были исследованы образцы: 15 подсолнечных масел, 13 пальмовых масел и 5 фракций пальмового масла, 2 образца оливкового масла, 3 образца кукурузного, 3 горчичных масел, масло виноградной косточки, конопляное, рисовое и 2 кокосовых масла, 7 заменителей молочного жира, 5 кондитерских жиров, технологическое вспомогательное средство, заменитель животного жира, 4 заменителя масла какао и 2 эквивалента масла какао. Кроме того, были проанализированы 11 маргаринов и 9 спредов различного состава. Также исследование проводилось в подсолнечных маслах, произведённых для эксперимента по изучению процессов окисления при хранении (всего 10 образцов). Характеристики указанных масел представлены в таблицах 2.1.1.2, 2.1.3.1 и 4.2.1.

2.1.2 Условия форсированного окисления подсолнечных масел (подготовительный эксперимент)

В целях изучения летучих вторичных продуктов окисления в настоящей работе использовали метод твердофазной микроэкстракции. Применение этого метода требует подбора адсорбирующего волокна в зависимости от его сродства к различным классам летучих веществ. *Подбор волокна для ТФМЭ* осуществляли с использованием трёх видов подсолнечных масел, предположительно отличающихся по подверженности к окислению и, соответственно, профилю летучих веществ: пресловое, масло после 1-го цикла очистки, масло после 4-х циклов очистки, произведённых в 2017 году. Выбранные масла подвергали форсированному окислению: 200 мл каждого вида масла смешивали с 5,4 мг $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, разливали по чашкам Петри диаметром 9,5 мм и 10,5 мм и толщиной слоя 0,9 см и помещали в климатическую камеру на 6 суток. Внутри камеры поддерживали следующие условия: влажность 30 %, температура $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ при постоянном искусственном

освещении и доступе воздуха. После 3 и 6 суток масло переносили в виалы из тёмного стекла на 22 мл так, чтобы не оставалось свободного пространства над пробой, закрывали крышками с септой и хранили в морозильной камере при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализа.

Метод ТФМЭ характеризуется тем, что разнообразие групп сорбируемых соединений и их количество зависят от условий проведения экстракции аналитов, а также от достижения равновесия между образцом, паровой фазой над ним и волокном. Поэтому в настоящей работе также *осуществляли подбор оптимальных условий для ТФМЭ*. Для этого использовали масло после 1-го цикла очистки, произведённое в 2018 году, которое подвергали форсированному окислению: 400 мл масла смешивали с 5,4 мг $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, разливали по чашкам Петри диаметром 9,5 мм и 10,5 мм и толщиной слоя 0,9 см и помещали в климатическую камеру на 1 сутки. Условия хранения: влажность 30 %, температура $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ при постоянном искусственном освещении и доступе воздуха. Затем масло переносили в виалы из тёмного стекла на 22 мл так, чтобы не оставалось свободного пространства над пробой, закрывали крышками с септой и хранили в морозильной камере при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализа.

Условия форсированного окисления устанавливались произвольно с тем чтобы обеспечить повышенное образование продуктов деградации жирных кислот (использование хлорида железа, влажность, аэрирование, освещение), характерных исключительно для начальных этапов окисления (температура не более $80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Различные типы масел, использованные в эксперименте по подбору волокна, были выбраны чтобы обеспечить предполагаемое максимальное разнообразие вторичных продуктов окисления в заданных условиях.

2.1.3 Условия нефорсированного окисления подсолнечных масел (основной эксперимент)

В исследовании по нефорсированному окислению подсолнечных масел использовали подсолнечные масла, полученные после одного, двух, и трех циклов очистки в 2018 году. Эти образцы масел выдерживали в климатической камере 2 месяца. Эксперимент в климатической камере осуществляли следующим образом. Около 150 мл каждого вида масла разливали в кварцевые стаканы (6 стаканов масла после одного цикла очистки и по 8 стаканов масел после двух и трех циклов очистки) и помещали в климатический шкаф при влажности 30 %, температуре $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ и при постоянном искусственном освещении и доступе воздуха. Каждую неделю после начала выдержки масел в климатической камере проводили отбор проб: по стакану с каждым видом масла извлекали из климатического шкафа, тщательно перемешивали стеклянной палочкой и разливали по заранее подготовленным флаконам тёмного стекла и различного объёма так,

чтобы не оставалось свободного пространства над пробой. Перед началом эксперимента аналогичным образом была отобрана проба каждого исходного масла (столбец 0 НЕД в таблице 2.1.3.1). Таким образом были получены все пробы подсолнечного масла, описание которых представлено в таблице 2.1.3.1. Одновременно проводили отбор проб для определения перекисного числа. Флаконы закрывали крышками с септой и хранили в морозильной камере при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализа.

Таблица 2.1.3.1 – Хранение подсолнечных масел в климатическом шкафу.

Тип масла	Срок хранения, в неделях								
	0 нед	1 нед	2 нед	3 нед	4 нед	5 нед	6 нед	7 нед	8 нед
1P1Д	1Д0Н	1Д1Н	1Д2Н	1Д3Н	1Д4Н	1Д5Н	1Д6Н		
1P2Д	2Д0Н	2Д1Н	2Д2Н	2Д3Н	2Д4Н	2Д5Н	2Д6Н	2Д7Н	2Д8Н
1P3Д	3Д0Н	3Д1Н	3Д2Н	3Д3Н	3Д4Н	3Д5Н	3Д6Н	3Д7Н	3Д8Н

Условия нефорсированного окисления устанавливали произвольно приближенными к стандартным. Температура была выбрана выше стандартной комнатной $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ на $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ для повышения скорости образования вторичных продуктов окисления.

Поскольку все исследованные образцы различались количеством дезодораций, а рафинации подвергались только один раз, для удобства в дальнейшем этот признак в кодировке не учитывали.

2.2 Характеристика оборудования

2.2.1 Изучение процессов окисления подсолнечного масла

- Весы электронные "Ohaus" Модель AR 3130
- Дозатор пипеточный 1-канальный Eppendorph, 100-1000 мкл
- Дозатор пипеточный 1-канальный Eppendorph, 10-250 мкл
- Хроматограф газовый Agilent Technologies 7890A с автосамплером Agilent Technologies 7683B Series (США) и пламенно-ионизационным детектором,
 - Колонка 100 м Agilent J&W GC Columns Select FAME, 25 мм $\ast 0,25\text{ }\mu\text{m}$ (Нидерланды).
 - Хроматограф газовый Agilent Technologies 7890A с квадрупольным масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975C, с пламенно-ионизационным детектором, США,
 - Колонка Supelcowax 10 60 м $\ast 0,53\text{ }\text{mm}$ с толщиной неподвижной фазы $1,0\text{ }\mu\text{m}$, США
 - Климатическая камера типа температура-влажность-освещение КК 240 (POL-EKO APARATURA, Польша)
 - Сушильный шкаф Binder FED 53, Германия
 - ИК-Фурье спектрометр TENSOR, Bruker Corporation, Германия

- Волокна для твердофазной микроэкстракции Supelco SPME StableFlex Fiber Assortment Kit, 57551-U, 24 Ga, для автосамплера, с покрытиями 65 мкм полидиметил/ дивинилбензол (П/Д), 50/30 мкм дивинилбензол/ карбоксен/ полидиметилсилоксан (Д/К/П), 85 мкм карбоксен/ полидиметилсилоксан (К/П), 85 мкм полиакрилат (П).

- Магнитная мешалка IKA-WERKE VF2, Германия
- Спектрофотометр SmartSpec™ 3000, BIO RAD, США

2.2.2 Определение содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола

- Газовый хроматограф Agilent Technologies 7890А, оснащенный тройным квадрупольным масс-селективным детектором Agilent Technologies 7000С (США) и автоматическим пробоотборником.

- Колонка HP-5 MS с фазой (5%-фенил)-метилполисилоксан, 30м×0,25мм×0,25 мкм, с малым уносом подвижной фазы (Agilent, США).

- Весы неавтоматического действия Ohaus AR 3130, США
- Дозаторы Eppendorf вместимостью 0,2; 1 и 5 см³ (с переменным объемом),
- Колбы мерные наливные с объемами 25 см³, 50 см³, 100 см³ по ГОСТ 1770-74,
- Цилиндры мерные объемом 25 см³ и 100 см³ по ГОСТ 1770-74.
- Центрифужный концентратор Centrifuge plus (Eppendorf);
- Орбитальный шейкер IKA-WERK VF2;
- Ультразвуковая баня SONOREX (Bandelin);
- Центрифуга для микропробирок Centrifuge-5424 (Eppendorf)

2.3 Характеристика аналитических стандартов и реактивов

2.3.1 Изучение процессов окисления подсолнечного масла

Стандартные вещества:

Стандартная смесь FAME 37 Component mix в дихлорметане, Sigma Aldrich, Bellefonte, США

Стандарт метилового эфира ундекановой кислоты (C11-МЭ), Sigma Aldrich, Bellefonte, США

Стандарт триглицерида тридекановой кислоты (ТАГС13), Toronto Research Chemicals, Торонто, Канада

Тестовая смесь н-углеводородов C5-C12, ООО «ХромЛаб»

Тридекан, ХЧ, ООО «ХромЛаб»

Тетрадекан, ХЧ, ООО «ХромЛаб»

Реактивы:

Фенолфталеин, ХЧ, «Химмед»

Крахмал картофельный, фармацевтический, «Химмед»

Тиосульфат натрия, фиксонал, 0,1 н (для титрования слабоокрашенных образцов с ПЧ \leq 10 мэкв. акт. О/кг использовали раствор с концентрацией 0,01 н, для остальных – 0,1 н), АО «Уралхиминвест»

Гидроксид натрия, фиксонал, 0,1 н, «Ленреактив»

p-Анизидин, \geq 99%, Aldrich

Бутилгидрокситолуол, фармацевтический, «Химмед»

Растворители:

Метанол, ХЧ, "Акватрия"

Хлороформ стабилизированный, ХЧ, "Химмед"

Ацетил хлорид, Acros organics, Бельгия

Гексан, ХЧ, «Химмед»

Уксусная кислота, ХЧ, "Химмед"

Диэтиловый эфир ХЧ, "Химмед"

Изооктан, ХЧ, "Химмед"

Вода, очищенная на системе Milli-Q, Merck Millipore (США, сопротивление 18,2 МОм)

2.3.2 Определение содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола**1. Стандартные вещества**

3-монохлорпропан-1,2-диол-1,1,2,3,3-d5 (3-МХПД-D5) (Sigma-Aldrich, содержание основного вещества \leq 97 %, изотопная чистота \leq 97,7 %);

3-монобромпропан-1,2-диол-1,1,2,3,3-d5 (3-МБПД-D5) (Toronto Research Chemicals (TRC), содержание основного вещества \leq 97 %, изотопная чистота \leq 98,4 %);

1,2-дипальмитоил-3-монохлорпропандиол-1,1,2,3,3-d5 (1,2-ПП-3-МХПД-D5) (TRC, содержание основного вещества \leq 98 %, изотопная чистота \leq 98 %);

1,3-дипальмитоил-2-монохлорпропандиол-1,1,2,3,3-d5 (1,3-ПП-2-МХПД-D5) (TRC, содержание основного вещества \leq 98 %, изотопная чистота \leq 97,4 %);

3-монохлорпропан-1,2-диол (3-МХПД) (TRC, содержание основного вещества \leq 98 %);

1,2-дипальмитоил-3-монохлорпропандиол (1,2-ПП-3-МХПД) (TRC, содержание основного вещества \leq 98 %);

1,3-дипальмитоил-2-монохлорпропандиол (1,3-ПП-2-МХПД) (TRC, содержание основного вещества \leq 98 %).

Глицидил пальмитат (TRC, содержание основного вещества \leq 98%)

Глицидол (TRC, содержание основного вещества \leq 95%)

2. Растворители, реактивы и расходные материалы.

Метанол (для ВЭЖХ), Merck

Толуол, ХЧ, «Химмед»

Изооктан, эталонный, «Химмед»

Натрия гидроксид, ч.д.а. (не менее 98,7 % вещества, ГОСТ 4328-77), "Химмед"

Диэтиловый эфир ХЧ, "Химмед"

Этилацетат ХЧ, "Химмед"

Гексан, ХЧ, "Химмед"

Кислота ортофосфорная, ОСЧ, «Химмед»

Вода, очищенная на системе Milli-Q, Merck Millipore (США, сопротивление 18,2 Мом)

Натрий бромистый, ХЧ, "Химмед"

Кислота фенилборная (ФБК) (P319590, Toronto Research Chemicals, содержание основного вещества не менее 95 %);

Гелий со степенью чистоты не менее 99,9999%;

Флаконы пластиковые с завинчивающейся крышкой объемом 15 см³;

Флаконы стеклянные на 7 мл, 15 мл, 22 мл

Микроцентрифужные флаконы Eppendorf с защелкивающейся крышкой объемом 2 см³;

Виалы стеклянные объемом 2 см³;

Пластиковые вставки в виалы объемом 0,25 см³;

Бумага индикаторная, ТУ 6-09-1181-89

2.4 Изучение процессов окисления подсолнечных масел и технологических контаминантов

2.4.1 Определение жирнокислотного состава

Определение жирнокислотного состава проводили методом переэтерификации в кислой среде по [155] с внутренним стандартом. Около 10 мг масла вносили в флаконы с завинчивающейся крышкой с прокладкой с записью массы. В флаконы приливали 800 мкл р-ра внутренних стандартов в метаноле (метилловый эфир ундекановой кислоты, С11:0-МЭ, С=0,593 мг/мл, глицерил тритридеcanoат, ТАГС13:0, С=0,513 мг/мл) и бутилгидрокситолуола (С=0,012 мг/мл). Метилловый эфир ундекановой кислоты использовали для количественного расчёта, глицерил тритридеcanoат – для контроля полноты переэтерификации, БГТ - в качестве антиокислителя. К пробам приливали 1 мл метанола, 20 мкл гексана и 20 мкл ацетилхлорида. Флаконы плотно закрывали крышками и после непродолжительного интенсивного взбалтывания помещали в сушильный шкаф на 1 час при 80 °С для получения метиловых эфиров жирных кислот реакцией

переэтерификации. После охлаждения проб до комнатной температуры приливали 2,5 мл гексана, 100 мкл воды и интенсивно перемешивали на лабораторном встряхивателе около 10 сек. После расслоения 1 мл верхнего гексанового слоя, содержащего метиловые эфиры, переносили в вials для ГХ-анализа.

Условия ГХ/ПВД анализа: объём ввода пробы 1 мкл, режим с делением потока 30:1, газ-носитель азот, скорость потока 0,9 мл/мин. Температура инжектора 260 °С, температура детектора 240 °С. Условия разделения: начальная температура 140 °С (изотерма в течение 5 мин.), затем увеличение со скоростью 4 °С/мин до 220 °С, изотерма 25 мин. Сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation Rev.B.04.03 [16] и «Microsoft Excel 2007» соответственно.

Определение содержания жирных кислот в качестве индивидуальных соединений рассчитывали по метиловому эфиру ундекановой кислоты в качестве внутреннего стандарта, полноту переэтерификации и экстрагирования метиловых эфиров в гексан контролировали с помощью стандарта ТАГС13. Также в расчёте использовались коэффициенты пересчёта содержания метиловых эфиров ЖК в свободные ЖК согласно стандартной процедуре, приведённой в статье [117]. За окончательный результат принимали среднее из трёх параллельных определений если не указано иное.

2.4.2 Определение перекисного числа

Для определения перекисного числа отбор проб проводили каждую неделю в течение всего срока хранения подсолнечных масел; измерения проводили в дни отбора проб. Перекисное число определяли по ГОСТ 51487-99 с некоторыми изменениями. Кратко: отбирали около 4 г масла в конические колбы на 100 мл с записью массы. К пробам по приливали 20 мл смеси уксусная кислота: хлороформ (2:1 об.об.), хорошо перемешивали и добавляли 1 мл 50% р-ра KI в воде, очищенной в системе Milli-Q. Сразу после этого пробы помещали в тёмное место на 20 минут. По прошествии указанного времени к пробам приливали 50 мл воды, очищенной в системе MilliQ, и титровали 0,01 н или 0,1 н р-м $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, точную концентрацию которого предварительно определяли согласно стандартной процедуре. Конечную точку определяли визуально по изменению цвета верхней фазы с буро-фиолетового на бесцветный при постепенном добавлении 1 % р-ра картофельного крахмала ближе к концу титрования. За окончательный результат принимали среднее из трёх параллельных определений, если не указано иное.

2.4.3 Определение анизидинового числа

Определение анизидинового числа проводили согласно ГОСТ 31756-2012 (ISO 6885:2006) Жиры и масла животные и растительные. Определение анизидинового числа (с

Поправками). В случае, если поглощение раствора *p*-анизидина в уксусной кислоте превышало 0,2 ATR Units проводили очистку *p*-анизидинового реактива согласно ГОСТ 31756-2012 по п.5.1.1 *Подготовка анизидинового реактива*.

2.4.4 Изучение динамики окисления методом ИК-спектроскопии⁶

ИК-спектры образцов масел снимали при помощи ИК-Фурье спектрометра TENSOR путём нанесения небольшого количества исследуемого образца масла на плоский элемент однократного отражения приставки для нарушенного полного внутреннего отражения (спектроскопия внутреннего отражения). В качестве итогового спектра образца были использованы усреднённые данные по 64-м измерениям в диапазоне частот от 4000 см⁻¹ до 574 см⁻¹ в трёх повторностях.

2.4.5 Определение летучих веществ масел методом ТФМЭ с ГХ/МС⁷

Определение летучих веществ проводили в 3 этапа:

а) подбор подходящего волокна для экстракции аналитов и предварительное изучение состава сорбирующихся вторичных продуктов окисления

б) подбор оптимальных условий экстракции аналитов путём построения центрального композиционного плана (ЦКП)

в) изучение летучих вторичных продуктов окисления подсолнечных масел при хранении.

а) При подборе подходящего волокна использовали коммерчески доступный набор со следующими покрытиями: 65 мкм полидиметил/ дивинилбензол (П/Д), 50/30 мкм дивинилбензол/ карбоксен/ полидиметилсилоксан (Д/К/П), 85 мкм карбоксен/ полидиметилсилоксан (К/П), 85 мкм полиакрилат (П). Перед анализом каждое волокно кондиционировали в соответствии с рекомендациями производителя.

Летучие вещества масел экстрагировали следующим образом: 10 мл заранее размороженного при комнатной температуре образца переносили во флакон на 20 мл с магнитным якорем и закрывали обжимной крышкой с септой. Образцы инкубировали в предварительно нагретом сушильном шкафу 15 минут при 40 °С, затем ставили на магнитную мешалку и размещали каждое волокно над пробой так, чтобы до поверхности образца оставалось не более 5 мм. Инкубацию проводили в течение 30 минут при 40 °С. Затем быстро вынимали иглу с волокном и сразу помещали их в инжектор, нагретый до 240 °С на 5 минут для десорбции [13].

^{6,7} Автор выражает благодарность к.ф.н., с.н.с. лаборатории химии пищевых продуктов ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» Малинкину Алексею Дмитриевичу за помощь в освоении данных методов анализа.

Условия ГХ/МС-анализа устанавливали согласно [265]. Температурная программа: начальная температура 35 °С в течение 5 мин, затем нагрев до 220 °С со скоростью 4 °С/мин, изотерма 40 минут. Газ-носитель - гелий, скорость потока 2 мл/мин, режим без деления потока. Параметры МС-детектирования: режим сканирования по полному ионному току, диапазон сканирования 35-400 m/z. Температура источника ионов 230 °С, температура квадрупольного анализатора 150 °С. Ионизация электронным ударом при 70 Эв.

Каждый раз перед анализом образца проводили регистрацию хроматограмм с волокон при указанных условиях без размещения над образцом (холостая проба) для учёта возможной сорбции на них сторонних соединений из воздуха. Хроматограммы каждого образца записывали 1 раз и обрабатывали с использованием программного обеспечения «MSD ChemStation E.02.02.1431». Идентификацию проводили для пиков, высота которых превышала три стандартных отклонения колебаний фонового сигнала (расположенного рядом с изучаемым пиком региона базовой линии). Идентификация не проводилась для соединений, относящихся к компонентам фаз волокон для ТФМЭ и фазы колонки (силоксаны и др.), составляющих воздуха (CO₂, N₂ и сторонних соединений).

Идентификацию летучих соединений масел проводили путём сравнения очищенного от фоновых ионов масс-спектра каждого пика с масс-спектрами коммерчески доступных библиотек, доступными в программе «The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Ver. 2.0 g, build May 19 2011», а также путём сопоставления рассчитанных индексов Ковача с известными значениями идентифицируемых соединений, характерными для полярных колонок, и приведёнными в открытых электронных базах данных химических соединений PubChem (электронный ресурс <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, дата последнего обращения 27.07.2021) и NistWebbook (электронный ресурс <https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>, дата последнего обращения 27.07.2021). Надёжной считалась идентификация, если коэффициент совпадения спектра с библиотечным превышал 700, а рассчитанный индекс Ковача находился в диапазоне известных значений или превышал/был ниже соответствующего крайнего значения не более чем на 20 единиц.

Классы опасности идентифицированных веществ устанавливали согласно списку загрязняющих веществ в атмосферном воздухе городских и сельских поселений СанПиН 1.2.3685-21 [2] и списку канцерогенов и возможных канцерогенов человека Международного агентства по изучению рака (МАИР) [27]. Обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ «Microsoft® Office Exel® 2016».

б) При подборе оптимальных условий экстракции летучих продуктов окисления было решено использовать один из способов построения дизайна эксперимента, т.н. ротatableльный центральный композиционный план (Rotatable Central Composite Design) для построения квадратичной модели поверхности отклика. Количество необходимых экспериментов для построения такого плана рассчитывалось исходя из следующей зависимости:

$$2^k + 2k + n = N, \quad ()$$

Где N – общее количество экспериментов плана,

k – количество варьирующих факторов

n – число экспериментов в центральной точке плана.

В данном эксперименте поиск и отбор значимых факторов проводился согласно результатам подобных исследований [239, 290]. Всего для оптимизации было выбрано 4 наиболее значимых фактора: температура экспозиции волокна над образцом или температура нагрева образца ($T_{\text{эксп}}$, °C), длительность экспозиции волокна над образцом ($t_{\text{эксп}}$, мин), температура десорбции аналитов в инжекторе или температура инжектора ($T_{\text{дес}}$, °C), а также время десорбции ($t_{\text{дес}}$, мин). Уровни варьирования факторов также устанавливали согласно данным литературы [199, 239, 328], при этом обязательным условием являлось предотвращение возможного новообразования целевых соединений в условиях высоких температур и длительности нагрева образца [199, 239]. Исходя из этого были установлены следующие уровни варьирования факторов (таблица 2.4.4.1):

Таблица 2.4.4.1 – Факторы, уровни и экспериментальная область условий, применяемых для оптимизации условий ТФМЭ-анализа.

Факторы	Код	Величины варибельности				
		$-\alpha$ (-2,000)	-1	0	+1	$+\alpha$ (2,000)
$T_{\text{эксп}}$, °C	x_1	20	30	40	50	60
$t_{\text{эксп}}$, МИН	x_2	10	20	30	40	50
$T_{\text{дес}}$, °C	x_3	210	225	240	255	270
$t_{\text{дес}}$, МИН	x_4	1	3	5	7	9

Другие параметры анализа, такие как количество образца и объём свободного пространства над образцом (10 мл масла в стеклянном флаконе на 20 мл) были установлены произвольно и таким образом, чтобы достичь максимально возможной концентрации всех аналитов в паровой фазе включая аналиты с низким содержанием. Одновременно такое количество пробы позволяло избежать прямого контакта образца с волокном.

Для оценки величин экспериментальной ошибки и потерь при обработке результатов эксперимента проводили 7 экспериментов в центральной точке плана. Также было проведено 16 экспериментов в ядре плана и 8 экспериментов в «звёздных точках»

(минимальные и максимальные уровни факторов). Величину «звёздного плеча», $\alpha=2^{k/4}$, рассчитывали с соблюдением условия ротатабельности плана, что позволило принять $\alpha=\pm 2,000$. Таким образом, всего был проведён 31 эксперимент в рандомизированном порядке для исключения влияния посторонних факторов на величину отклика. Матрица кодированных величин факторов представлена в таблице 2.4.4.2.

Таблица 2.4.4.2–Рабочая матрица 4-х факторного эксперимента для подбора оптимальных условий экстракции для ТФМЭ-анализа.

№ опыта	X _{0б}	T _{эксп} , °C	t _{эксп} , мин	T _{дес} , °C	t _{дес} , мин	T _{эксп} , °C	t _{эксп} , мин	T _{дес} , °C	t _{дес} , мин
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	+	-1	-1	-1	-1	30	20	225	3
2	+	1	-1	-1	-1	50	20	225	3
3	+	-1	1	-1	-1	30	40	225	3
4	+	1	1	-1	-1	50	40	225	3
5	+	-1	-1	1	-1	30	20	255	3
6	+	1	-1	1	-1	50	20	255	3
7	+	-1	1	1	-1	30	40	255	3
8	+	1	1	1	-1	50	40	255	3
9	+	-1	-1	-1	1	30	20	225	7
10	+	1	-1	-1	1	50	20	225	7
11	+	-1	1	-1	1	30	40	225	7
12	+	1	1	-1	1	50	40	225	7
13	+	-1	-1	1	1	30	20	255	7
14	+	1	-1	1	1	50	20	255	7
15	+	-1	1	1	1	30	40	255	7
16	+	1	1	1	1	50	40	255	7
17	+	2	0	0	0	60	30	240	5
18	+	-2	0	0	0	20	30	240	5
19	+	0	2	0	0	40	50	240	5
20	+	0	-2	0	0	40	10	240	5
21	+	0	0	2	0	40	30	270	5
22	+	0	0	-2	0	40	30	210	5
23	+	0	0	0	2	40	30	240	9
24	+	0	0	0	-2	40	30	240	1
25	+	0	0	0	0	40	30	240	5
26	+	0	0	0	0	40	30	240	5
27	+	0	0	0	0	40	30	240	5
28	+	0	0	0	0	40	30	240	5
29	+	0	0	0	0	40	30	240	5
30	+	0	0	0	0	40	30	240	5
31	+	0	0	0	0	40	30	240	5

Условия ГХ/МС-анализа и идентификации летучих компонентов масел устанавливали аналогично пункту 2.4.5 а).

Для оптимизации условий экстракции отбирали целевые летучие соединения подсолнечных масел из списка идентифицированных компонентов по принципу наибольшей адсорбции на волокне Д/К/П и интенсивности на хроматограммах (интенсивность сигнала на хроматограмме более 10^6 единиц (abundance)), а также по наличию установленного класса опасности:

- согласно списку СанПиН 1.2.3685-21 [2] **от 3 класса и выше,**
- согласно списку Международного агентства по изучению рака (МАИР) [27] **от класса 2В и выше.**

Расшифровка классов опасности представлена в табл. 2.4.4.3.

Таблица 2.4.4.3 - Классификация опасных веществ

Документ	Описание группы веществ	Группа
СанПиН 1.2.3685-21	вещества умеренно опасные	3
	вещества высокоопасные	2
	чрезвычайно опасные	1
Монографии МАИР по выявлению канцерогенных опасностей для человека	возможные канцерогены для человека	2В
	вероятные канцерогены человека	2А
	вещества с установленной канцерогенностью	1

После проведения каждого эксперимента центрального композиционного плана оценивали следующие величины (ед. измерения):

1. Суммарная площадь пиков
2. Общее количество обнаруженных соединений (n)
3. Суммарная площадь обнаруженных альдегидов
4. Общее количество альдегидов (n)
5. Суммарная площадь α,β -ненасыщенных альдегидов
6. Суммарная площадь спиртов
7. Суммарная площадь
8. Суммарная площадь соединений, имеющих класс опасности 2 и выше и 2В и выше

в). Экстракцию летучих продуктов для изучения окисления масел проводили следующим образом: 10 мл заранее размороженного при комнатной температуре образца переносили во флакон на 20 мл с магнитным якорем и закрывали обжимной крышкой с септой. Образцы инкубировали в предварительно нагретом сушильном шкафу 15 минут при 40 °С, затем ставили на магнитную мешалку и размещали каждое волокно над пробой так, чтобы до поверхности образца оставалось не более 5 мм. Инкубацию проводили в течение 20 минут при 40 °С. Затем быстро вынимали иглу с волокном и сразу помещали

их в инжектор, нагретый до 255 °С на 3 минуты для десорбции условия согласно результатам оптимизации (пункт 2.4.5 б).

Условия ГХ/МС-анализа и идентификации летучих компонентов масел устанавливали аналогичные пункту 2.4.5 а).

2.4.6 Определение содержания технологических контаминантов эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в пищевых маслах

За основу методики был взят стандарт ISO 18363-2:2018, который в настоящей работе претерпел некоторые изменения. Скорректированная методика основана на одновременном определении этерифицированных и свободных (если таковые имеются) форм 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в виде фенолборных дериватов свободных 3-МХПД, 2-МХПД и 3-МБПД соответственно в пищевых растительных маслах и животных жирах методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с использованием тройного квадрупольного масс-селективного детектора. В процессе длительного щелочного гидролиза при низких температурах происходит отщепление жирных кислот от 3-МХПДЭ, 2-МХПДЭ и ГЭ. При этом практически отсутствуют побочные реакции, например образование глицидола из МХПД. Добавление бромида натрия останавливает реакцию переэтерификации и способствует образованию из глицидола более стабильной молекулы 3-МБПД (3-МБПД >> 2-МБПД). Последующая реакция с фенолборной кислотой позволяет осуществлять разделение, идентификацию и детектирование одновременно всех аналитов методом ГХ/МС-МС.

1. Приготовление растворов внутренних стандартов.

а) 3-МХПД-d5 в метаноле с концентрацией 10 мкг/мл: 10 мг аналита количественно переносили в мерную колбу на 50 мл путём внесения в виалу с аналитом метанола, перемешивания раствора на орбитальном шейкере до растворения аналита и переносом внесённого объёма в мерную колбу на 50 мл с помощью дозатора. Процедуру повторяли 3-4 раза. Затем в ту же колбу вносили 25 см метанола, перемешивали, доводили до метки метанолом и снова перемешивали. 2,5 мл полученного раствора переносили в другую мерную колбу на 50 мл, доводили до метки метанолом и перемешивали.

б) 3-МБПД-d5 в метаноле с концентрацией 10 мкг/мл: 1 мг аналита количественно переносили в мерную колбу на 50 мл путём внесения в виалу с аналитом метанола, перемешивания раствора на орбитальном шейкере до растворения аналита и переносом внесённого объёма в мерную колбу на 50 мл с помощью дозатора. Процедуру повторяли 3-4 раза. Затем в ту же колбу вносили 25 см метанола, перемешивали, доводили до метки метанолом и снова перемешивали. 2,5 мл полученного раствора переносили в другую мерную колбу на 50 мл, доводили до метки метанолом и перемешивали.

с) *Совместный раствор 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5 и 1,3-дипальмитоил-2-МХПД-d5 в толуоле с концентрациями 25,6 мкг/мл каждого.* 2,5 мг каждого аналита количественно переносили в отдельные мерные колбы на 25 мл путём внесения в вials с аналитами толуола, перемешивания растворов на орбитальном шейкере до растворения аналитов и переносом внесённых объёмов с помощью дозатора. Процедуру повторяли 3-4 раза, объёмы доводили до метки толуолом и перемешивали. Затем 6,40 мл каждого полученного раствора переносили в другую мерную колбу на 25 мл, доводили до метки толуолом и перемешивали.

2. Приготовление стандартных растворов для градуировки

а) *Совместный раствор 3-МХПД и глицидола:* 10 мг 3-МХПД и глицидола отвешивали (погрешность взвешивания $\pm 0,5$ мг) в мерную колбу на 100 мл, добавляли 25 мл метанола, перемешивали до полного растворения аналитов и доводили до метки метанолом. Из полученного раствора концентрацией каждого вещества 100 мкг/мл путём последовательных разведений готовили рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,05 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,50 мкг/мл, 2,00 мкг/мл и 5,00 мкг/мл.

б) *Совместный раствор 1,2-дипальмитоил-3-МХПД и 1,3-дипальмитоил-2-МХПД:* отвешивали 10 мг 1,3-дипальмитоил-2-МХПД в мерную колбу на 100 мл, раствор тщательно перемешивали, доводили до метки толуолом и снова перемешивали. 10 мг 1,2-дипальмитоил-3-МХПД количественно переносили в другую мерную колбу на 100 мл путём внесения в вial толуола, перемешивания раствора на орбитальном шейкере до растворения аналита и переносом внесённого объёма с помощью дозатора. Процедуру повторяли 3-4 раза, раствор доводили до метки толуолом и перемешивали.

В мерную колбу на 25 мл переносили по 6,65 мл каждого раствора, доводили до метки толуолом и перемешивали. Из полученного раствора концентрацией каждого вещества 26,6 мкг/мл (эквивалентно концентрациям свободных 3-МХПД и 2-МХПД 5 мкг/мл каждого) путём последовательных разведений готовили рабочие стандартные растворы 1,2-дипальмитоил-3-МХПД и 1,3-дипальмитоил-2-МХПД с концентрациями, эквивалентными свободным 3-МХПД и 2-МХПД 0,05 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,50 мкг/мл, 2,00 мкг/мл и 5,00 мкг/мл каждого.

3. Подготовка стандартных растворов и приготовление проб с добавкой:

Эквивалентная концентрация каждого аналита 1,0 мг/кг

а) *Приготовление раствора 1,2-дипальмитоил-3-МХПД с концентрацией 100 мкг/мл:* 10 мг 1,2-дипальмитоил-3-МХПД количественно переносили в мерную колбу на 100 мл путём внесения в вial толуола, перемешивания раствора на орбитальном

шейкере до растворения аналита и переносом внесённого объёма с помощью дозатора. Процедуру повторяли 3-4 раза, раствор доводили до метки толуолом и перемешивали.

b) Приготовление раствора 1,3-дипальмитоил-2-МХПД с концентрацией 500 мкг/мл: 25 мг 1,2-дипальмитоил-3-МХПД количественно переносили в мерную колбу на 50 мл путём внесения в виалу толуола, перемешивания раствора на орбитальном шейкере до растворения аналита и переносом внесённого объёма с помощью дозатора. Процедуру повторяли 3-4 раза, раствор доводили до метки толуолом и перемешивали.

c) Приготовление раствора глицидол пальмитата с концентрацией 100 мкг/мл: 10 мг глицидол пальмитата количественно переносили в мерную колбу на 100 мл путём внесения в виалу толуола, перемешивания раствора на орбитальном шейкере до растворения аналита и переносом внесённого объёма с помощью дозатора. Процедуру повторяли 3-4 раза, раствор доводили до метки толуолом и перемешивали.

d) Пробы с добавкой готовили следующим образом:

- *Концентрация эфиров МХПД и глицидола 0,06 мг/кг каждого.* В стеклянный флакон на 15 мл на весах вносили 120 мкл совместного раствора 1,2-дипальмитоил-3-МХПД и 1,3-дипальмитоил-2-МХПД с концентрациями 26,6 мкг/мл (которые предварительно приготовили из растворов 1,2-ПП-3-МХПД с концентрацией 100 мкг/мл и 1,3-ПП-2-МХПД с концентрацией 500 мкг/мл) и 25 мкл 100 мкг/мл раствора глицидол пальмитата. Затем в флакон приливали нерафинированное оливковое масло так, чтобы масса содержимого флаконы составила около 10 г, полученную массу записывали. Флакон плотно закрывали крышкой с прокладкой и тщательно перемешивали на лабораторном встряхивателе.

- *Концентрация эфиров МХПД и глицидола 1 мг/кг каждого.* В стеклянный флакон на 15 мл на весах вносили 531 мкл 100 мкг/мл раствора 1,2-дипальмитоил-3-МХПД, 106 мкл 500 мкг/мл раствора 1,3-дипальмитоил-2-МХПД и 422 мкл 100 мкг/мл раствора глицидол пальмитата. Затем в флакон приливали нерафинированное оливковое масло так, чтобы масса содержимого флаконы составила около 10 г, полученную массу записывали. Флакон плотно закрывали крышкой с прокладкой и тщательно перемешивали на лабораторном встряхивателе. Впоследствии пробу с добавкой готовили из расчёта на 3 грамма суммарной массы масла и растворителя с соответствующим уменьшением объёма вносимых растворов стандартов.

- *Концентрация эфиров МХПД и глицидола 30 мг/кг каждого.* В стеклянный флакон на 7 мл на весах вносили 1,594 мл раствора 1,2-дипальмитоил-3-МХПД, 319 мкл 500 мкг/мл раствора 1,3-дипальмитоил-2-МХПД и 1,265 мл 100 мкг/мл раствора глицидол пальмитата. Затем в флакон приливали нерафинированное оливковое масло так, чтобы

масса содержимого флаконы составила около 1 г, полученную массу записывали. Флакон плотно закрывали крышкой с прокладкой и тщательно перемешивали на лабораторном встряхивателе.

Таким образом были получены растворы со следующими концентрациями:

Таблица 2.4.6.1 – Итоговые концентрации градуировочных растворов, растворов стандартов и проб с добавками с учётом чистоты реактивов (в т.ч. изотопной) и погрешностей дозирования. С – концентрация, Сэкв. – эквивалентная концентрация

Тип раствора	Аналиты	Описание раствора	Расчётная концентрация аналитов	
Градуировочные растворы, С мкг/мл	3-МХПД Глицидол	Совместный р-р в метаноле, С=0,05	0,050 0,050	
	3-МХПД Глицидол	Совместный р-р в метаноле, С=0,20	0,200 0,199	
	3-МХПД Глицидол	Совместный р-р в метаноле, С=0,50	0,500 0,497	
	3-МХПД Глицидол	Совместный р-р в метаноле, С=2,00	2,000 1,990	
	3-МХПД Глицидол	Совместный р-р в метаноле, С=5,00	5,000 4,974	
	1,2-ПП-3-МХПД 1,3-ПП-2-МХПД	Совместный р-р в толуоле, Сэкв.=0,05	0,050 0,050	
	1,2-ПП-3-МХПД 1,3-ПП-2-МХПД	Совместный р-р в толуоле, Сэкв.=0,20	0,200 0,200	
	1,2-ПП-3-МХПД 1,3-ПП-2-МХПД	Совместный р-р в толуоле, Сэкв.=0,50	0,050 0,050	
	1,2-ПП-3-МХПД 1,3-ПП-2-МХПД	Совместный р-р в толуоле, Сэкв.=2,00	2,002 2,002	
	1,2-ПП-3-МХПД 1,3-ПП-2-МХПД	Совместный р-р в толуоле, Сэкв.=5,00	5,006 5,006	
	Растворы стандартов, С мкг/мл	3-МХПД-d5	Раствор в метаноле, С=10	9,477
		3-МБПД-d5	Раствор в метаноле, С=10	9,545
		1,2-ПП-3-МХПД-d5 1,3-ПП-2-МХПД-d5	Совместный р-р в толуоле, С=25,6	24,61 24,46
	Пробы с добавкой С мг/кг	1,2-ПП-3-МХПД, 1,3-ПП-2-МХПД, ГП	Совместный р-р в оливковом масле, С=0,06	0,059 0,059 0,058
1,2-ПП-3-МХПД, 1,3-ПП-2-МХПД, ГП		Совместный р-р в оливковом масле, С=1	0,982 0,980 0,983	
1,2-ПП-3-МХПД, 1,3-ПП-2-МХПД, ГП		Совместный р-р в оливковом масле, С=30	22,49 22,51 22,49	

4. Приготовление растворов реактивов:

a) Раствор гидроксида натрия концентрацией 2,5 мг/мл метанола: в мерную колбу на 100 мл помещали 250 мг гидроксида натрия (погрешность взвешивания $\pm 0,5$ мг), добавляли около 50 мл метанола, тщательно перемешивали, доводили до метки и снова перемешивали. рН полученного раствора проверяли с помощью индикаторной бумаги.

b) Раствор подкислённого бромиды натрия 55%: в мерную колбу на 100 мл помещали навеску бромида натрия 55 г (погрешность взвешивания $\pm 0,5$ мг), добавляли около 85 мл деионизированной воды и перемешивали до полного растворения соли. Затем доводили до метки водой и снова перемешивали. К приготовленному раствору приливали 0,33 мл концентрированной ортофосфорной кислоты. Приготовленный раствор проверяли на способность нейтрализовать рН раствора гидроксида натрия: к 500 мкл раствора

щелочи приливали 600 мкл подкислённого раствора соли и перемешивали. Контроль pH проводили с использованием индикаторной бумаги. Растворы считали готовыми к работе при достижении pH 5-7.

c) *Смесь диэтилового эфира и этилацетата 2:3 (об.)*: в колбу на 50 мл дозировали 19 мл диэтилового эфира и 28,5 мл этилацетата и перемешивали. Смесь готовили непосредственно перед использованием.

d) *Раствор фенолборной кислоты (ФБК)*: в мерную колбу на 50 мл помещали 1 г фенолборной кислоты, 100 мкл деионизированной воды и 25 мл диэтилового эфира. Раствор тщательно перемешивали, доводили до метки диэтиловым эфиром и снова перемешивали. Для анализа использовали только чистую надосадочную жидкость.

5. Подготовка проб для калибровки:

Подготовка проб совместного раствора 3-МХПД и глицидола: 600 мкл рабочих стандартных растворов с концентрациями 0,01 мкг/мл, 0,05 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,50 мкг/мл, 2,00 мкг/мл и 5,00 мкг/мл помещали в пластиковые флаконы на 10 мл и добавляли по 50 мкл растворов внутренних стандартов 3-МХПД-d5 и 3-МБПД-d5 с концентрациями 10 мкг/мл. Добавляли 600 мкл раствора подкисленного бромид натрия и 1 мл смеси диэтилового эфира и этилацетата для экстракции аналитов. После расслоения фаз отбирали верхний слой в другую пластиковую флакон, а экстракцию повторяли. Объединённые экстракты упаривали без нагревания с помощью центрифужного концентратора. Затем к пробам приливали 1 мл раствора ФБК, перемешивали и оставляли не менее чем на 15 минут. После этого пробы упаривали до полного высыхания на центрифужном концентраторе без нагревания и вносили 1 мл изооктана. Затем пробы озвучивали с помощью ультразвуковой ванны до разбиения белёсого осадка, жидкость переносили в микроцентрифужные флаконы на 2 мл и центрифугировали при не менее 13000 об/мин (не менее 15700 g) течение 5 минут. Около 150 мкл надосадочной жидкости переносили в пластиковые виалы уменьшенного объёма для ГХ и плотно закрывали крышкой.

Подготовка проб совместного раствора 1,2-дипальмитоил-3-МХПД и 1,3-дипальмитоил-2-МХПД. 600 мкл рабочих стандартных растворов с эквивалентными концентрациями свободных 3-МХПД и 2-МХПД 0,01 мкг/мл, 0,05 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,50 мкг/мл, 2,00 мкг/мл и 5,00 мкг/мл помещали в пластиковые флаконы на 10 мл и добавляли 100 мкл раствора внутренних стандартов 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5 и 1,3-дипальмитоил-2-МХПД-d5 с эквивалентной концентрацией каждого 5 мкг/мл. К пробам приливали 600 мкл диэтилового эфира, перемешивали и помещали в морозильную камеру при -25 °C на 30 мин для предварительного охлаждения. Затем, не размораживая проб,

вносили 500 мкл раствора гидроксида натрия, перемешивали и помещали в морозильную камеру при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. По прошествии не менее чем 16 часов к пробам приливали 600 мкл подкислённого раствора бромида натрия, не допуская при этом размораживания проб. Затем пробы перемешивали на лабораторном встряхивателе и упаривали верхний слой без нагревания. После этого к пробам приливали по 600 мкл гексана, перемешивали и после разделения фаз верхний слой удаляли. Эту процедуру отмывки от жирных кислот повторяли ещё раз. Затем к пробам приливали 900 мкл смеси диэтилового эфира и этилацетата, перемешивали и после разделения фаз верхний слой переносили в другую флакон. Повторяли экстракцию аналитов ещё раз. Объединенные экстракты упаривали без нагревания. После этого в пробы вносили 1 мл раствора ФБК, оставляли не менее чем на 15 минут и упаривали в микроцентрифужном концентраторе без нагревания. К пробам приливали 1 мл изооктана, озвучивали в ультразвуковой ванне до разбиения белёсого осадка и жидкость переносили в микроцентрифужные флаконы на 2 мл. Флаконы центрифугировали при не менее чем 13000 об/мин (не менее 15700 g), затем 150 мкл верхнего надосадочного слоя переносили в пластиковые виалы уменьшенного объёма для ГХ и плотно закрывали крышкой.

б. Подготовка проб пищевых масел и жиров:

Жидкие пищевые масла анализировали без предварительной обработки. Твёрдые масла и жиры перед отбором проб расплавляли до жидкого состояния в сушильном шкафу при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Эмульсионные жировые продукты, такие как спреды и маргарины, предварительно растапливали (там, где это было возможно) для отделения жировой фазы и проводили анализ в ней. Жировую фазу отделяли следующим образом: 2-3 г образца отбирали в пластиковые флаконы, плотно закрывали крышками и помещали в сушильный шкаф при температуре $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до расслоения жировой и водной фаз. Затем образцы центрифугировали, для анализа отбирали чистый верхний слой жира.

Около 100 мг (погрешность отбора ± 20 мг) масла или жира помещали в флаконы А и Б на 10 мл с записью массы. К пробе А приливали по 50 мкл растворов 3-МХПД-d5 и 3-МБПД-d5 концентрацией каждого вещества 10 мкг/мл. В пробу Б добавляли 100 мкл совместного раствора 1,2-дипальмитат-3-МХПД-d5 и 1,3-дипальмитат-2-МХПД-d5 концентрацией каждого 5 мкг/мл. Далее пробы А и Б готовили одинаково. К пробам приливали 600 мкл диэтилового эфира, перемешивали и помещали в морозильную камеру при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 30 мин для предварительного охлаждения. Затем, не размораживая проб, вносили 500 мкл раствора гидроксида натрия, перемешивали и помещали в морозильную камеру при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. По прошествии не менее чем 16 часов к пробам приливали 600 мкл подкислённого раствора бромида натрия, не допуская при этом размораживания проб.

Затем пробы перемешивали на лабораторном встряхивателе и упаривали верхний слой без нагревания. После этого к пробам приливали по 600 мкл гексана, перемешивали и после разделения фаз верхний слой удаляли. Эту процедуру отмывки от жирных кислот повторяли ещё раз. Затем к пробам приливали 900 мкл смеси диэтилового эфира и этилацетата, перемешивали и после разделения фаз верхний слой переносили в другую флакон. Повторяли экстракцию аналитов ещё раз. Объединенные экстракты упаривали без нагревания. После этого к пробам вносили 1 мл раствора ФБК, оставляли не менее чем на 15 минут и упаривали без нагревания. К пробам приливали 1 мл изооктана, озвучивали в ультразвуковой ванне до разбиения белёсого осадка и жидкость переносили в микроцентрифужные флаконы на 2 мл. Флаконы центрифугировали при не менее чем 13000 об/мин (не менее 15700 g), затем 150 мкл верхнего надосадочного слоя переносили в пластиковые виалы уменьшенного объёма для ГХ и плотно закрывали крышкой.

Пробы с добавками готовили аналогичным образом.

7. Параметры работы хромато-масс-спектрометра были настроены следующим образом:

Температурная программа: начальная температура 60 °С, затем 5 °С/мин до 190 °С, 20 °С/мин до 280 °С, изотерма 5 мин, по окончании 300 °С 5 мин. Режим ввода пробы без деления потока, вводимый объём 1 мм³, температура инжектора 250 °С, лайнер конический одинарный, для режима без деления потока, со стекловатой. Газ-носитель – гелий, скорость потока 1,2 мл/мин, режим постоянного потока. Температура интерфейса 280 °С, температура источника 230 °С, температура квадруполя 150 °С. Тройной квадруполь настраивали для работы в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM).

8. Построение градуировочного графика и расчёт содержаний аналитов:

Для построения градуировочной зависимости анализировали рабочие стандартные градуировочные растворы различных уровней концентраций в указанных условиях. Затем строили графики зависимости массы аналита во вводимой пробе от отношения площади хроматографического пика аналита к площади пика внутреннего стандарта для каждого фрагментного иона, используемого для количественного определения. Построение графиков и расчёт концентраций в неизвестных пробах проводилось при помощи программного обеспечения MassHunter Workstation Software. Quantitative Analysis для ГХ/МС. Версия В.08.00/Сборка 8.0.598.0.

Градуировочный график считался приемлемым, если рассчитанное значение квадрата коэффициента корреляции для градуировочной прямой каждого фрагментного иона, используемого для количественного определения, составляла не менее 0,98.

Расчёт содержания аналитов в исследуемом образце пищевого масла проводился следующим образом:

$$C_{3\text{-МХПД (проба А)}} = \frac{G_1 * 0,6}{m}; \quad (1)$$

$$C_{\text{глицидола (проба А)}} = \frac{G_2 * 0,6}{m}; \quad (2)$$

$$C_{3\text{-МХПД (проба Б)}} = \frac{G_3 * 0,6}{m}; \quad (3)$$

$$C_{2\text{-МХПД (проба Б)}} = \frac{G_4 * 0,6}{m}; \quad (4)$$

$$C_{\text{глицидола (проба Б)}} = \frac{C_{3\text{-МХПД (проба Б)}}}{C_{3\text{-МХПД (проба А)}}} * C_{\text{глицидола (проба А)}}; \quad (5)$$

где $C_{3\text{-МХПД (проба А)}}$ – содержание 3-МХПД в пробе А, мкг/г;

$C_{\text{глицидола (проба А)}}$ – содержание глицидола в пробе А, мкг/г;

$C_{3\text{-МХПД (проба Б)}}$ – содержание 3-МХПД в пробе Б, мкг/г;

$C_{2\text{-МХПД (проба Б)}}$ – содержание 2-МХПД в пробе Б, мкг/г;

$C_{\text{глицидола (проба Б)}}$ – содержание глицидола в пробе Б, мкг/г;

G_1 – масса 3-МХПД во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе А, рассчитанная по градуировке, мкг;

G_2 – масса глицидола во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе А, рассчитанная по градуировке, мкг;

G_3 – масса 3-МХПД во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе Б, рассчитанная по градуировке, мкг;

G_4 – масса 2-МХПД во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе Б, рассчитанная по градуировке, мкг;

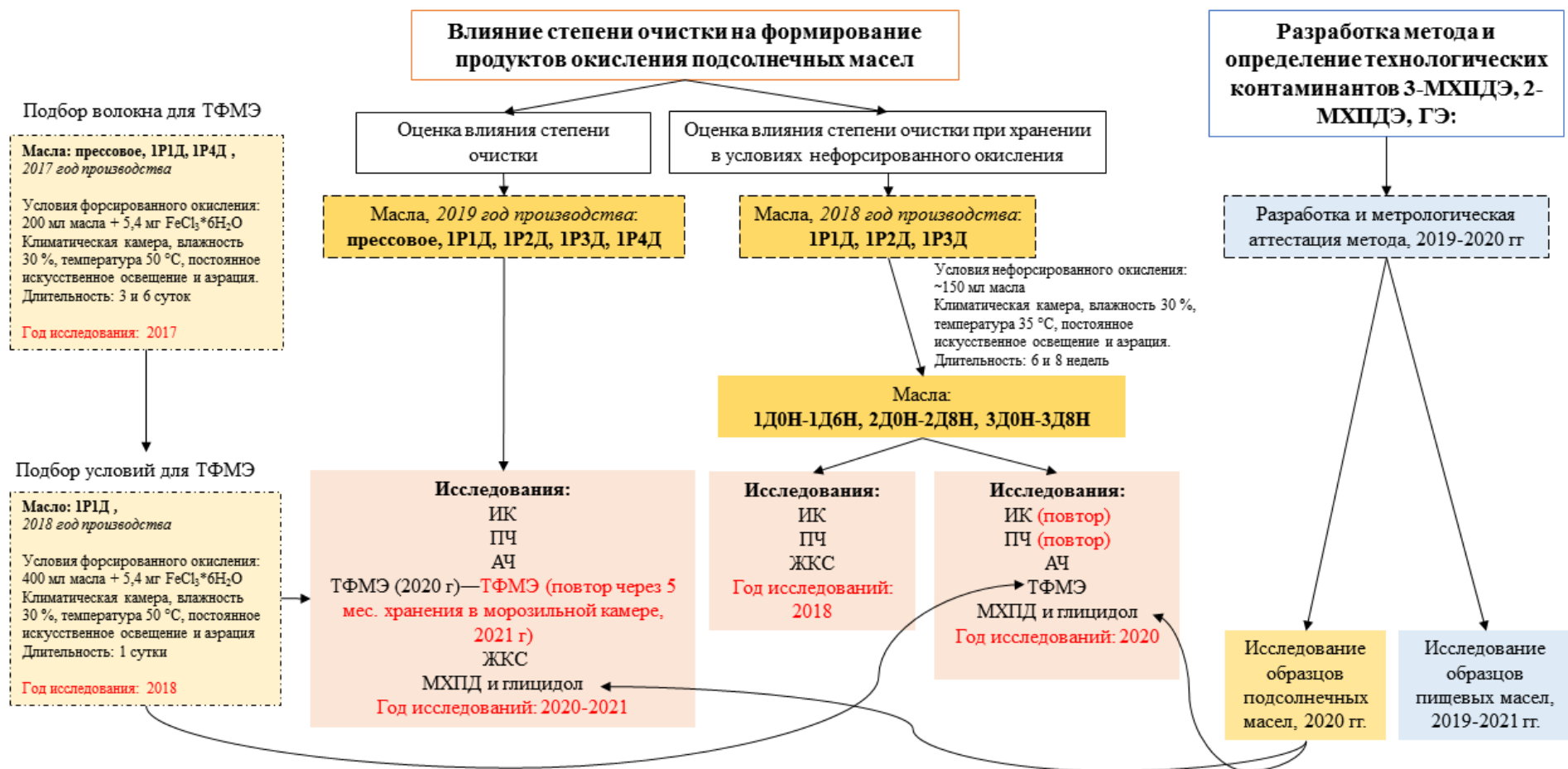
m – масса навески образца, г.

2.5 Методы статистической обработки экспериментальных данных

Статистические расчёты и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения OriginPro 2018 SR1 b9.5.1.195. Построение центрального композиционного ротатабельного плана и его дисперсионный анализ (ANOVA) осуществляли в Design Expert® Version 12 Trial. Графические иллюстрации создавали в OriginPro 2018 SR1 b9.5.1.195, Microsoft Excel® 2016 MSO (16.0.12527.21930) и Design Expert® Version 12 Trial.

2.6 Схема исследования

Для большей наглядности структура настоящего исследования приведена на блок-схеме ниже

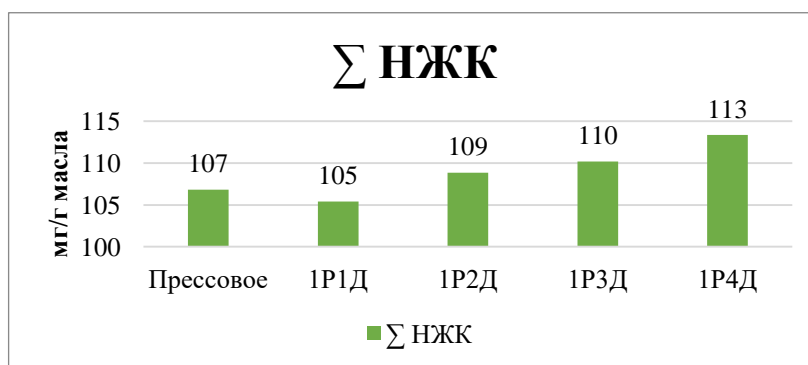


ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ОКИСЛЕНИЯ ПОДСОЛНЕЧНЫХ МАСЕЛ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ОЧИСТКИ

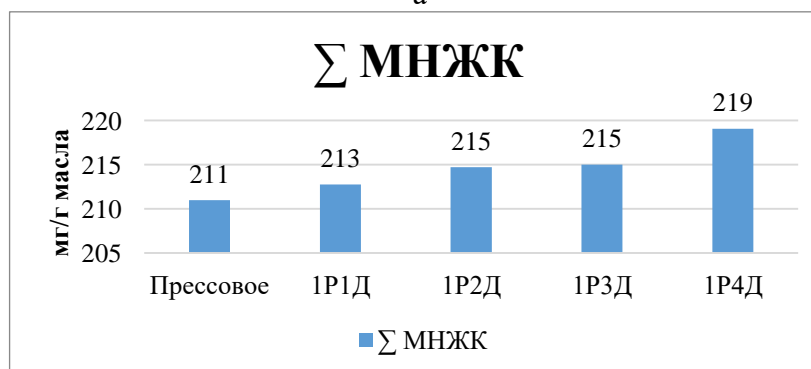
3.1 Изменение жирнокислотного состава подсолнечных масел в процессе многократной очистки и при хранении

Оценку окислительных изменений подсолнечных масел разной степени очистки начинали со сравнения состава ЖК. Содержание жирных кислот считали по группам, в которых: сумму ПНЖК составляли линолевая С18:2, α -линоленовая С18:3; сумму МНЖК – пальмитолеиновая С16:1 9-цис, олеиновая С18:1 9-цис, сумма изомеров гондоиновой С20:1; сумму НЖК – миристиновая С14:0, пальмитиновая С16:0, маргариновая С17:0, стеариновая С18:0, арахидиновая С20:0, бегеновая С22:0, лигноцериновая С24:0; сумму транс-изомеров – элаидиновая С18:1 9-транс, вакценовая С18:1 11-транс, изо-октадекадиеновая С18:2 9-транс,12-транс, цис-,транс-линолевая С18:2 9-цис,12-транс, транс-,цис -линолевая С18:2 9-транс,12-цис.

На рисунке 3.1.1 представлены диаграммы сумм поли-, моно-, ненасыщенных жирных кислот в прессовом подсолнечном масле, а также в маслах после одной, двух, трёх и четырёх дезодораций.



а



б

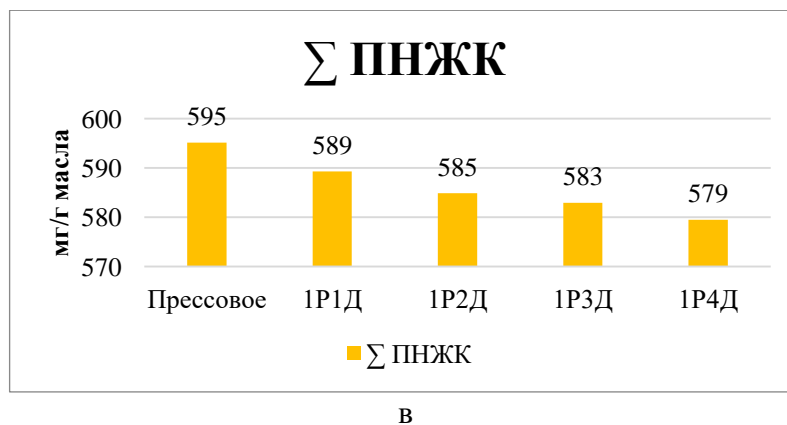


Рис. 3.1.1 Сравнение содержания групп жирных кислот в образцах подсолнечного масла производства 2019 года неочищенного, после одной, двух, трёх и четырёх дезодораций. Значения представлены в виде среднего из 2 параллельных измерений. а - сумма НЖК, б - сумма МНЖК (без учёта трансизомеров с одной двойной связью), в – сумма ПНЖК.

Из представленных данных видно, что имеется тенденция к увеличению количества насыщенных (рис. 3.1.1 а) и мононенасыщенных жирных кислот (рис. 3.1.1 б) в зависимости от количества очисток подсолнечного масла. Суммарное содержание линолевой С18:2 и α-линоленовой С18:3 кислот наоборот, снижалось (рис. 3.1.1 в).

Диаграмма разброса трансизомеров ЖК показывает, что содержание этих кислот менялось в зависимости от количества циклов очистки подсолнечного масла (рис. 3.1.2):

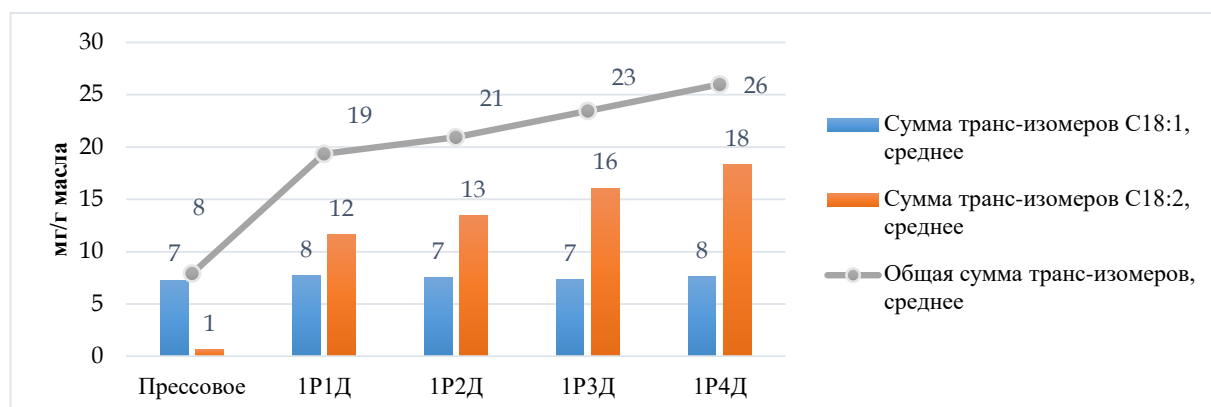


Рис.3.1.2 Сравнение содержания трансизомеров олеиновой и линолевой кислот в общей сумме транс-изомеров подсолнечных масел в зависимости от степени очистки. Данные представлены в виде среднего из 2 параллельных измерений. Исследованные масла: прессовое, 1P1Д – 1 рафинация, 1 дезодорация; 1P2Д – 1 рафинация, 2 дезодорации; 1P3Д – 1 рафинация, 3 дезодорации; 1P4Д – 1 рафинация, 4 дезодорации.

Прессовое подсолнечное масло, в отличие от очищенных масел, содержало главным образом транс-изомеры олеиновой кислоты – элаидиновую С18:1 9-транс и вакценовую С18:1 11-транс. После первой рафинации и дезодорации содержание этих кислот осталось приблизительно тем же. Однако количество транс-изомеров линолевой кислоты - главным образом 9-цис-,12-транс-линолевой С18:2, 9-транс-,12-цис -линолевой С18:2 и в меньшей степени изо-октадекадиеновой С18:2 9-транс,12-транс - заметно выросло и продолжало расти с увеличением количества повторных дезодораций.

Анализ динамики состава жирных кислот в течение 6-8 недель хранения в условиях нефорсированного окисления представлен в таблицах 3.1.1, 3.1.2 и 3.1.3:

Таблица 3.1.1 Содержание жирных кислот в мг/г масла в рафинированном дезодорированном подсолнечном масле (1Р1Д, 2018 г) при хранении в климатическом шкафу при 35 °С и с постоянной аэрацией и освещением. Значения представлены в виде среднего из 2-х параллельных измерений (если не указано иное) \pm стандартное отклонение

Срок окисления	Общая сумма жирных кислот	Сумма транс-изомеров ЖК	Сумма ПНЖК	Сумма МНЖК	Сумма НЖК
Неокисленное	882 \pm 3	53 \pm 0	524 \pm 3	204 \pm 1	101 \pm 1
1 неделя (n=3)	847 \pm 2	51 \pm 0	505 \pm 1	196 \pm 0	95 \pm 1
2 неделя	882 \pm 7	53 \pm 0	526 \pm 1	205 \pm 0	98 \pm 5
3 неделя	880 \pm 0	53 \pm 0	519 \pm 2	204 \pm 0	104 \pm 2
4 неделя	936 \pm 33	57 \pm 2	571 \pm 26	207 \pm 3	101 \pm 2
5 неделя	921 \pm 19	55 \pm 1	553 \pm 16	209 \pm 1	102 \pm 0
6 неделя	907 \pm 20	55 \pm 2	546 \pm 23	205 \pm 2	101 \pm 2
Коэффициент корреляции Пирсона	0,71829	0,72572	0,70921	0,61783	0,40525
p (уровень значимости корреляции) при $\alpha=0,05$	0,06903	0,06485	0,07433	0,13927	0,36709

Общая сумма жирных кислот составила 847 мг/г масла - 936 мг/г масла, из которых на ПНЖК приходилось в среднем 505 мг/г масла - 571 мг/г масла, сумма МНЖК – 196 мг/г масла - 209 мг/г масла, сумма НЖК колебалась в диапазоне 95 мг/г масла - 104 мг/г масла, а сумма транс-изомеров - 51 мг/г масла - 57 мг/г масла. Согласно статистическому анализу во всех группах жирных кислот достоверного изменения в зависимости от продолжительности нахождения в климатическом шкафу обнаружено не было.

Результаты анализа содержания групп жирных кислот в подсолнечном масле 1Р2Д представлены в таблице 3.1.2:

Таблица 3.1.2 Содержание жирных кислот в мг/г масла в рафинированном дезодорированном подсолнечном масле (1Р2Д, 2018 г) при хранении в климатическом шкафу при 35 °С и с постоянной аэрацией и освещением. Значения представлены в виде среднего из 2-х параллельных измерений (если не указано иное) \pm стандартное отклонение

Срок окисления	Общая сумма жирных кислот	Сумма транс-изомеров ЖК	Сумма ПНЖК	Сумма МНЖК	Сумма НЖК
Неокисленное	889 \pm 15	19 \pm 1	546 \pm 16	218 \pm 2	106 \pm 4
1 неделя (n=3)	849 \pm 9	18 \pm 0	524 \pm 7	211 \pm 1	96 \pm 1
2 неделя	882 \pm 2	19 \pm 0	538 \pm 1	219 \pm 0	106 \pm 3
3 неделя	878 \pm 1	19 \pm 0	537 \pm 1	219 \pm 1	103 \pm 0
4 неделя	921 \pm 29	20 \pm 1	571 \pm 24	224 \pm 2	105 \pm 2
5 неделя	908 \pm 10	19 \pm 0	557 \pm 7	225 \pm 2	106 \pm 1
6 неделя	897 \pm 3	19 \pm 0	549 \pm 1	223 \pm 1	105 \pm 0
7 неделя	894 \pm 5	19 \pm 0	540 \pm 4	222 \pm 0	113 \pm 1
8 неделя	888 \pm 9	19 \pm 0	539 \pm 4	223 \pm 3	106 \pm 2
Коэффициент корреляции Пирсона	0,43725	0,56954	0,21557	0,70642	0,5648
p (уровень значимости корреляции) при $\alpha=0,05$	0,23924	0,10942	0,5775	0,03339	0,11308

Общая сумма жирных кислот в подсолнечном масле 1Р2Д составила 849 мг/г масла - 921 мг/г масла, из которых на ПНЖК приходилось в среднем 524 мг/г масла - 571 мг/г масла, на МНЖК – 211 мг/г масла - 225 мг/г масла, сумма НЖК колебалась в диапазоне 95 мг/г масла - 113 мг/г масла, а сумма транс-изомеров - 18 мг/г масла - 20 мг/г масла.

Аналогично маслу 1Р1Д, содержание отдельных групп жирных кислот в подсолнечном масле 1Р2Д на всем протяжении хранения в климатическом шкафу менялось не значимо. Однако, можно отметить тенденцию ($p=0,03$) к накоплению мононенасыщенных жирных кислот к 8 неделе хранения в климатическом шкафу. При сравнении содержания транс-изомеров масел 1Р1Д и 1Р2Д можно отметить значимое падение количества этих кислот после второй рафинации (в среднем с 54 мг/г масла до 19 мг/г масла), что не согласуется с данными исследования масел от 2019 года (рис. 3.1.2)

Результаты анализа содержания отдельных групп жирных кислот в подсолнечном масле 1Р3Д представлены в таблице 3.1.3:

Таблица 3.1.3 Содержание жирных кислот в мг/г масла в рафинированном дезодорированном подсолнечном масле (1Р3Д, 2018 г) при хранении в климатическом шкафу при 35 °С и с постоянной аэрацией и освещением. Значения представлены в виде среднего из 2-х параллельных измерений (если не указано иное) \pm стандартное отклонение

Срок окисления	Общая сумма жирных кислот	Сумма транс-изомеров ЖК	Сумма ПНЖК	Сумма МНЖК	Сумма НЖК
Неокисленное	883 \pm 4	23 \pm 0	533 \pm 6	219 \pm 0	107 \pm 3
1 неделя (n=3)	851 \pm 6	22 \pm 0	518 \pm 4	212 \pm 1	98 \pm 1
2 неделя	883 \pm 5	23 \pm 0	532 \pm 4	220 \pm 1	107 \pm 0
3 неделя	875 \pm 3	23 \pm 0	524 \pm 4	218 \pm 1	109 \pm 2
4 неделя	960 \pm 5	25 \pm 0	597 \pm 3	228 \pm 1	109 \pm 1
5 неделя	917 \pm 12	24 \pm 1	560 \pm 15	225 \pm 3	108 \pm 1
6 неделя	912 \pm 15	24 \pm 1	554 \pm 13	226 \pm 1	108 \pm 1
7 неделя	896 \pm 2	23 \pm 0	537 \pm 1	226 \pm 0	109 \pm 0
8 неделя	894 \pm 1	23 \pm 0	533 \pm 2	226 \pm 0	111 \pm 1
Коэффициент корреляции Пирсона	0,41468	0,3477	0,25705	0,76347	0,63585
r (уровень значимости корреляции) при $\alpha=0,05$	0,26711	0,35921	0,50432	0,01666	0,06567

Общая сумма жирных кислот в подсолнечном масле 1Р3Д составила 851 мг/г масла - 959 мг/г масла, из которых на ПНЖК приходилось в среднем 518 мг/г масла - 597 мг/г масла, на МНЖК – 212 мг/г масла - 228 мг/г масла, сумма НЖК колебалась в диапазоне 98 мг/г масла - 111 мг/г масла, а сумма транс-изомеров - 22 мг/г масла - 25 мг/г масла. Статистический анализ показал наличие тенденции к накоплению мононенасыщенных жирных кислот, которая стала более явной в масле 1Р3Д ($p=0,02$) по сравнению с маслом 1Р2Д.

Таким образом установлено, что наибольший вклад в изменение жирнокислотного состава подсолнечного масла вносила степень очистки. Мягкие условия окисления

исследованных масел не позволили обнаружить статистически значимого изменения количеств как отдельных групп жирных кислот, так и их суммы.

3.2 Изменение перекисного числа подсолнечных масел в процессе многократной очистки и при хранении

Анализ содержания перекисей в маслах разной степени очистки показал, что больше всего титруемых продуктов окисления содержалось в прессовом масле; последующие рафинация и дезодорация снизили ПЧ подсолнечного масла в 2,5 раза и с учётом погрешности анализа этот показатель оставался практически неизменными после следующих очисток (рисунок 3.2.1):

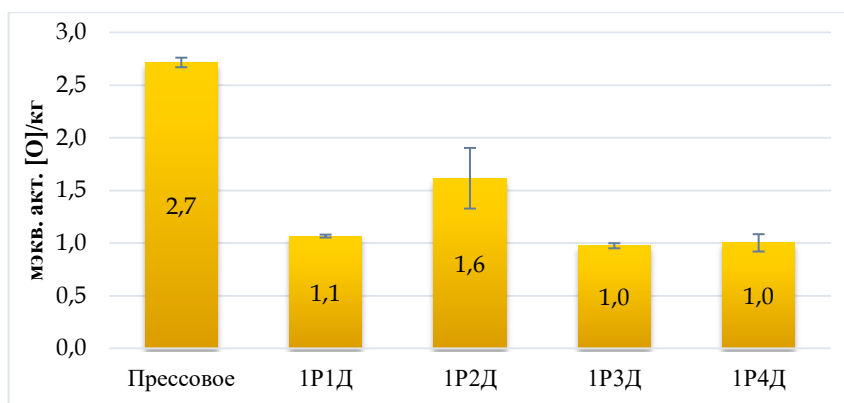


Рис. 3.2.1 Сравнение содержания первичных продуктов окисления в подсолнечных маслах разной степени очистки (2019 год производства). Значения представлены в виде среднего из 3 параллельных определений $\pm \delta$.

Изменение перекисного числа масел при хранении в течение 6-8 недель в климатическом шкафу представлено на рисунке 3.2.2:

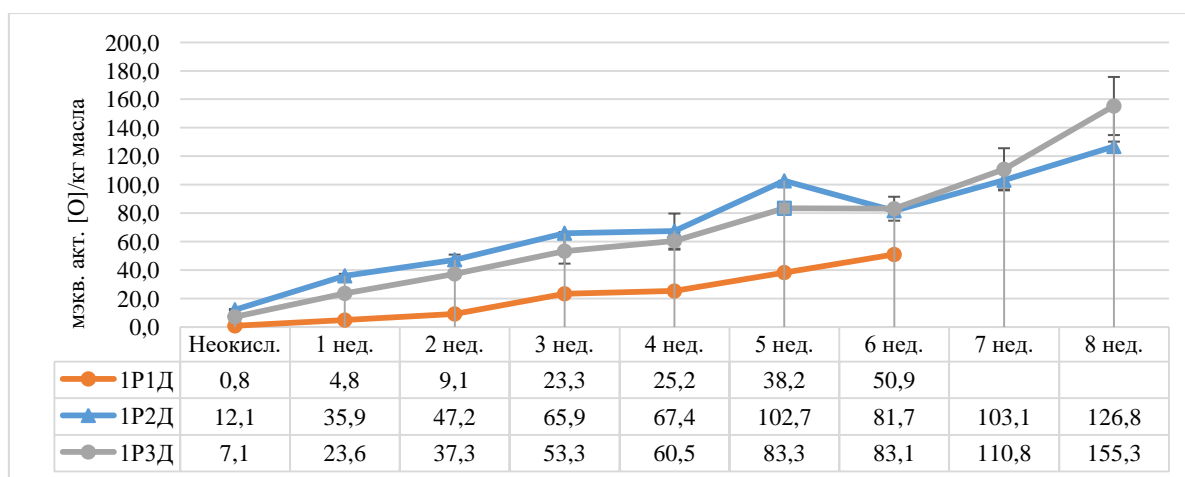


Рис. 3.2.2 Динамика перекисного числа подсолнечных масел различной степени очистки при хранении в течение 6-8 недель в климатическом шкафу при 35 °С, с постоянной аэрацией и освещением (2018 год производства). Значения представлены в виде среднего из 3-х параллельных измерений \pm стандартное отклонение.

Согласно полученным данным, перекисное число росло в течение всего периода хранения во всех группах масел. В масле 1P1Д накапливалось достоверно меньше ($p < 0,001$) первичных продуктов окисления, чем в маслах после двух и трёх дезодораций.

Максимально допустимое значение перекисного числа 10 мэкв. акт. О/кг масла, как показателя безопасности согласно ТР ТС 024/2011, маслом 1Р1Д было достигнуто спустя чуть больше двух недель хранения в климатической камере, тогда как в масле 1Р2Д содержание перекисей было выше норматива сразу после дезодорации, а в масле 1Р3Д - через несколько дней после помещения на хранение в климатическую камеру.

Сравнивая результаты определения перекисного числа в маслах от 2018 г и 2019 г можно отметить разницу в начальном содержании перекисей. Так, в маслах 1Р1Д, 1Р2Д, 1Р3Д от 2019 года ПЧ составило 1,1 мэкв. акт. [О]/кг, 1,6 мэкв. акт. [О]/кг, 1,1 мэкв. акт. [О]/кг соответственно, тогда как в аналогичных маслах от 2018 года этот показатель был 0,8 мэкв. акт. [О]/кг, 12,1 мэкв. акт. [О]/кг и 7,1 мэкв. акт. [О]/кг соответственно. Предположительно, эту разницу можно объяснить различием исходного сырья и/или условиями хранения масел от момента производства и до поступления в лабораторию, где они были сразу заморожены.

К концу срока хранения в масле 1Р1Д содержалось в 66,8 раза больше перекисных соединений по сравнению с пробами до окисления (6 недель хранения), тогда как в масле 1Р2Д – больше в 6,7 раз после 6 недель хранения и в 10,5 раз после 8 недель хранения, в масле 1Р3Д – больше в 11,7 раз и 21,8 раз после 6 и 8 недель хранения соответственно. Это говорит о различной скорости накопления первичных продуктов окисления. И действительно, в исследованных маслах она заметно отличалась (рисунок 3.2.3):

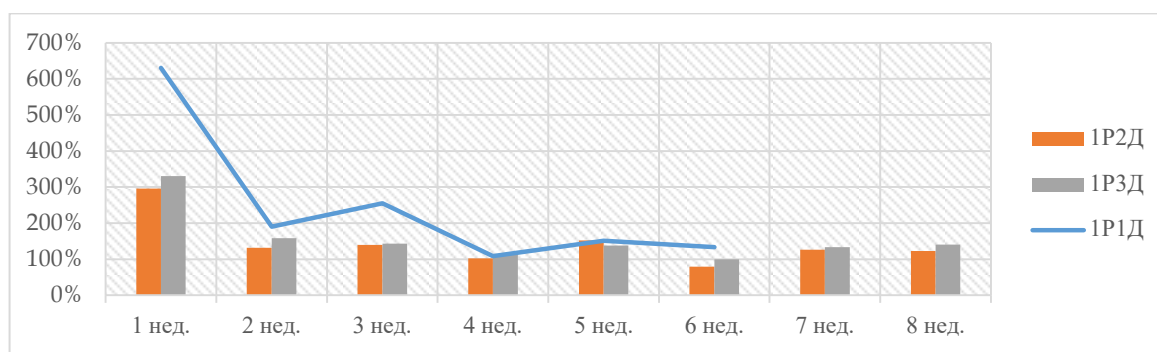


Рис. 3.2.3 Скорость накопления первичных продуктов окисления в подсолнечных маслах разной степени очистки в течение 6-8 недель хранения при 35 °С, освещении и аэрации (2018 год производства). 1Р1Д – масло рафинированное дезодорированное, 1Р2Д - масло рафинированное дезодорированное 2 раза, 1Р3Д - масло рафинированное дезодорированное 3 раза.

Быстрее всего содержание продуктов перекисного окисления росло в масле 1Р1Д в течение первой недели хранения (631% прироста), затем скорость упала до 190% прироста к 2 неделям хранения, и далее колебалась в пределах 108-255% прироста.

Накопление первичных продуктов в маслах после двух и трёх дезодораций проходило примерно с одинаковой скоростью. Наиболее быстрый рост количества продуктов перекисного окисления приходился на первую неделю – 296% и 331% в маслах 1Р2Д и 1Р3Д соответственно, ко второй неделе окисления этот показатель снижался и

затем держался в пределах 80-158% для обоих видов масел в течение всего последующего периода хранения.

Таким образом, рафинированное дезодорированное подсолнечное масло содержало меньше компонентов, способных реагировать с молекулярным йодом, нежели масла 1Р2Д и 1Р3Д, однако прирост их содержания в масле 1Р1Д в целом был гораздо выше, и был особенно высоким в течение первых двух недель хранения в климатической камере. После 4 недель хранения накопление первичных продуктов окисления проходило во всех маслах примерно с одинаковой скоростью.

3.3 Изменение анизидинового числа подсолнечных масел в процессе многократной очистки и при хранении

Содержание вторичных продуктов окисления оценивали одним из общепринятых методов - путём спектрофотометрического определения анизидинового числа. Результаты измерений представлены на рисунке 3.3.1:

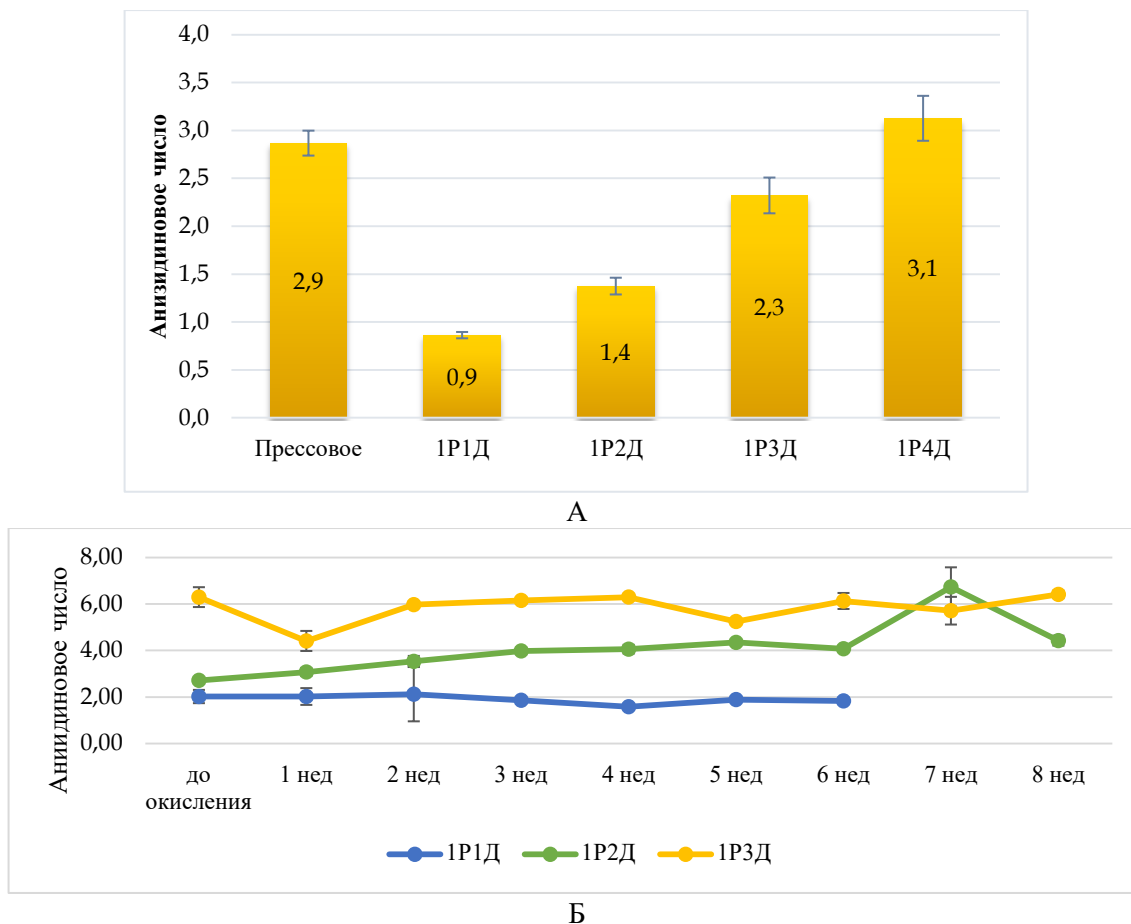


Рис. 3.3.1 Содержание вторичных продуктов окисления (ди- и мононенасыщенных альдегидов и кетонов) в подсолнечных маслах после различного количества дезодораций (2019 год производства, рис. 3.3.1А) и в очищенных маслах течение 6-8 недель хранения в климатическом шкафу при 35 °С, освещении и аэрации (2018 год производства, рис. 3.3.1Б). Результат представлен в виде среднего из двух параллельных измерений $\pm \delta$.

С увеличением количества дезодораций подсолнечного масла (1Р1Д-1Р4Д) содержание ди- и мононенасыщенных альдегидов и кетонов постепенно росло, что

отражено на рис. А. В исследованном прессовом масле содержание веществ, вступивших в реакцию с *p*-анизидином, оказалось близко к таковому в масле после 4 дезодораций (1Р4Д). При этом условно щадящие условия хранения подсолнечных масел разной степени очистки не вызывали значимого накопления ди- и мононенасыщенных альдегидов и кетонов (рис. Б). Дисперсионный анализ полученных данных по маслам 1Р1Д-1Р3Д подтвердил значимость влияния количества дезодораций на величину анизидинового числа ($p > 0,05$).

3.4 Исследование процессов окисления подсолнечных масел методом ИК-спектроскопии

Оценку изменений состава подсолнечного масла при повторяющейся очистке и в процессе нефорсированного хранения проводили также методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье. Для характеристики полученных спектров использовали данные литературы [14, 121].

Рисунок 3.4.1 представляет объединённые ИК-спектры подсолнечных масел от прессового до рафинированного дезодорированного 4 раза (1Р4Д) в диапазоне волновых чисел $3500\text{-}600\text{ см}^{-1}$.

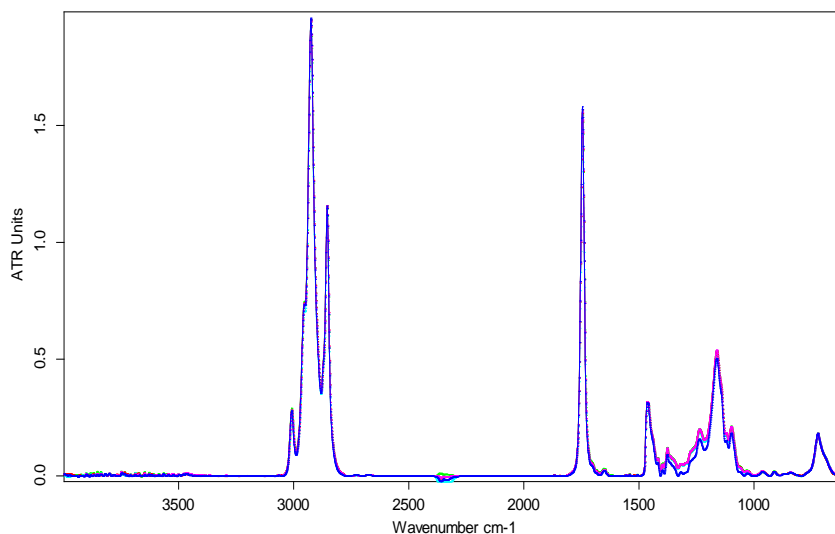


Рис. 3.4.1 Общий вид наложенных ИК-спектров подсолнечных масел производства 2019 года. Зелёный – прессовое масло, синий - масло 1Р1Д, розовый - масло 1Р2Д, красный - масло 1Р3Д, голубой - масло 1Р4Д.

Все полученные спектры достаточно схожи, однако при детальном рассмотрении можно отметить небольшие различия. В диапазоне волновых чисел $3100\text{ см}^{-1}\text{-}2700\text{ см}^{-1}$ прослеживается общая тенденция к снижению интенсивности полос поглощения от прессового масла к маслу 1Р4Д, характерная для симметричных/ассимметричных валентных колебаний метиленовых $\nu(-\text{CH}_2-)$ (2925 см^{-1} , 2854 см^{-1}) и метильных $\nu(-\text{CH}_3)$ (2953 см^{-1} , 2872 см^{-1}) групп, а также снижение полосы валентного колебания *цис*-олефиновой двойной связи $\nu(-\text{CH}=\text{CH}-)$ при 3009 см^{-1} (рисунок 3.4.2 А). При этом по

интенсивности колебаний полос метиленовых $\nu(-\text{CH}_2-)$ групп образцы прессового масла и масел 1Р1Д-1Р3Д заметно отличаются от образца 1Р4Д. Снижение интенсивности при 3009 см^{-1} , 2953 см^{-1} и 2872 см^{-1} с увеличением степени очистки происходило более равномерно среди исследованных образцов.

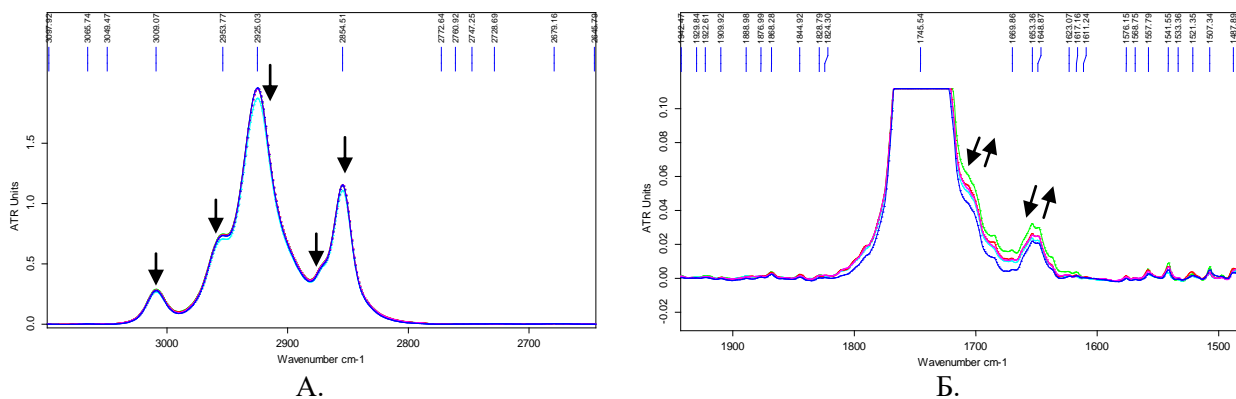


Рис. 3.4.2 Изменения в ИК-спектрах неокисленных подсолнечных масел 2019 года производства в зависимости от глубины очистки. А. – регион $3100\text{--}2700\text{ см}^{-1}$, Б. – регион $1800\text{--}1600\text{ см}^{-1}$). Зелёный – прессовое масло, синий - масло 1Р1Д, розовый - масло 1Р2Д, красный - масло 1Р3Д, голубой - масло 1Р4Д. Стрелками обозначены направления изменений интенсивности и сдвигов полос поглощений. Рисунки большего формата представлены в Приложении Г.

В диапазоне $1900\text{ см}^{-1}\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ к наиболее важным изменениям можно отнести изменения интенсивности полос при 1745 см^{-1} , 1701 см^{-1} , 1684 см^{-1} , 1670 см^{-1} , 1653 см^{-1} , 1648 см^{-1} и 1636 см^{-1} . Полосу при 1745 см^{-1} относят к колебаниям сложноэфирной связи ацилглицеридов $\nu(-\text{C}=\text{O}-)$, плечо при 1701 см^{-1} предположительно свидетельствует о колебаниях в карбонильной группе свободных жирных кислот $\nu(-\text{R}-\text{COOH})$ (рисунок 3.4.2 Б). Наличие отдельного небольшого плеча при волновом числе 1684 см^{-1} , полосы при 1670 см^{-1} и её плеча при 1636 см^{-1} может говорить о присутствии ненасыщенных альдегидов, альдегидов с конъюгированной двойной связью, а также α,β -ненасыщенных альдегидов и кетонов соответственно. Полосы при 1653 см^{-1} , 1648 см^{-1} свидетельствуют о наличии валентного колебания *cis*-олефиновой двойной связи $\nu(-\text{CH}=\text{CH}-)$, причём в отличие от полосы при 3009 см^{-1} интенсивность этих двух полос уменьшалась в порядке прессовое-1Р3Д-1Р2Д-1Р4Д-1Р1Д и наиболее сильные отличия в интенсивности имеют масла прессовое и 1Р1Д. Такая же последовательность была характерна и для остальных отмеченных полос в этом регионе за исключением полосы при 1745 см^{-1} . Изменение её интенсивности было аналогично таковым у полос метиленовых $\nu(-\text{CH}_2-)$ групп при 2925 см^{-1} , 2854 см^{-1} . Для большей наглядности абсолютные значения ATR Units, соответствующие волновым числам 1701 см^{-1} , 1684 см^{-1} , 1670 см^{-1} , 1653 см^{-1} , 1648 см^{-1} и 1636 см^{-1} , были выведены отдельным графиком на рис. 3.4.10.

Регион «отпечатков пальцев» 1500 см^{-1} - 600 см^{-1} также характеризовался разнонаправленным изменением интенсивности основных полос поглощения, и здесь наиболее сильно отличалось от остальных масло после однократной очистки (1Р1Д) (рисунок 3.4.3). Можно отметить уменьшение интенсивности деформационных колебаний метиленовых $\nu(-\text{CH}_2-)$ групп в порядке пресловое-1Р2Д-1Р3Д-1Р1Д-1Р4Д при волновых числах 1464 см^{-1} и 722 см^{-1} , в порядке пресловое-1Р2Д-1Р3Д-1Р4Д-1Р1Д при волновом числе 1238 см^{-1} ; и метильных $\nu(-\text{CH}_3)$, волновое число 1377 см^{-1} групп, падение интенсивности поглощения простой эфирной связи $\nu(-\text{C}-\text{O}-)$ при 1162 см^{-1} (в порядке 1Р2Д-пресловое-1Р3Д-1Р4Д-1Р1Д). Порядок уменьшения интенсивности полос пресловое-1Р2Д-1Р3Д-1Р1Д-1Р4Д был также характерен для всего региона 1418 см^{-1} - 1030 см^{-1} , куда входят полосы метиленовых $\nu(-\text{CH}_2-)$ (1238 см^{-1}) и метильных $\nu(-\text{CH}_3)$ (1376 см^{-1}) групп, а также полоса эфирной связи $\nu(-\text{C}-\text{O}-\text{C}-)$ (1030 см^{-1}).

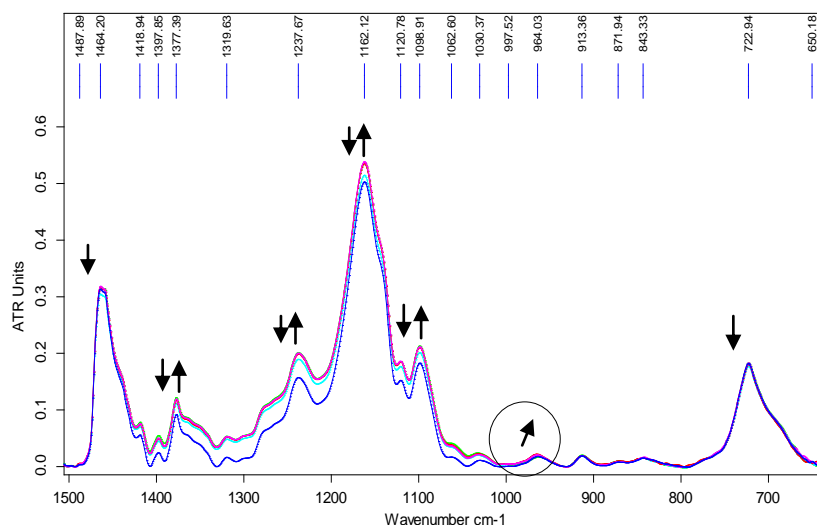


Рис. 3.4.3 Изменения в ИК-спектрах неокисленных подсолнечных масел 2019 года производства в зависимости от глубины очистки, регион $1500\text{--}600\text{ см}^{-1}$. Зелёный – пресловое масло, синий - масло 1Р1Д, розовый - масло 1Р2Д, красный - масло 1Р3Д, голубой - масло 1Р4Д. Стрелками обозначены направления изменений интенсивности и сдвигов полос поглощений. Рисунок большего формата представлен в Приложении Г.

Отмечено, что при общей разнонаправленности изменений ИК-спектров, полоса поглощения, характерная для деформационного колебания изолированных *транс*, *транс*-двойных связей ($-\text{C}=\text{CH}-$), сдвигалась с 963 см^{-1} до 965 см^{-1} строго с увеличением степени очистки образцов, а её интенсивность росла с $0,017\text{ ATR Units}$ до $0,021\text{ ATR Units}$. Эти данные в совокупности с общей тенденцией к уменьшению интенсивности колебаний полос двойных связей (например, при 3009 см^{-1} , 1653 см^{-1} и 1648 см^{-1}) могут говорить об изменении конфигурации двойных связей жирных кислот и/или вторичных продуктов окисления с *цис*, *цис*- на *транс*, *транс*- в процессе многократной очистки масла.

Аналогично было проведено исследование подсолнечных масел 1Р1Д, 1Р2Д и 1Р3Д, произведённых в 2018 году. Наложение полученных ИК-спектров масел 1ДОН-

1Д6Н не выявило заметно выделяющихся образцов. Основные полосы поглощения, такие как при волновых числах 3009 см^{-1} , 2953 см^{-1} , 2954 см^{-1} , 2854 см^{-1} , 1745 см^{-1} , 1464 см^{-1} , 1162 см^{-1} были немного более интенсивными у образца 1Д0Н (синий цвет) (рис. 3.4.4).

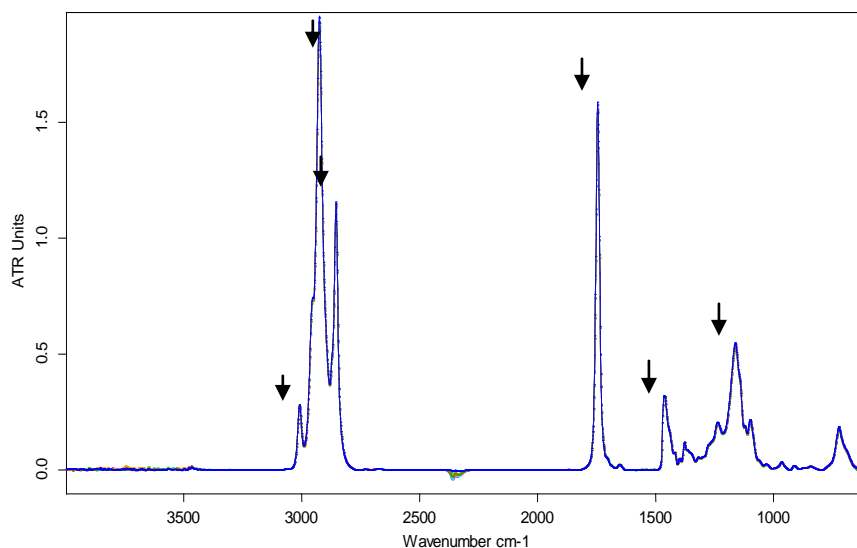


Рис. 3.4.4 Наложение ИК-спектров подсолнечных масел 2018 года производства после однократной дезодорации (1Р1Д) и при хранении в течение 6 недель в климатическом шкафу при $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, с постоянными аэрацией и освещением. Синий – масло до хранения (1Д0Н), оливковый – 1Д1Н, оранжевый – 1Д2Н, голубой – 1Д3Н, розовый – 1Д4Н, зелёный – 1Д5Н, красный – 1Д6Н.

При более детальном рассмотрении региона $1900\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ можно отметить разнонаправленное изменение интенсивности полос, характерных для, предположительно, свободных жирных кислот или ненасыщенных кетонов (1701 см^{-1}), ненасыщенных альдегидов (1684 С , 1670 см^{-1}) и ненасыщенных карбонильных соединений (1653 см^{-1} и 1648 см^{-1}), общее увеличение их интенсивности проходило в порядке 1Д1Н-1Д0Н-1Д4Н-1Д6Н-1Д3Н-1Д2Н-1Д5Н (рис. 3.4.5 А) (более наглядно это иллюстрировано на рисунке 3.4.10.)

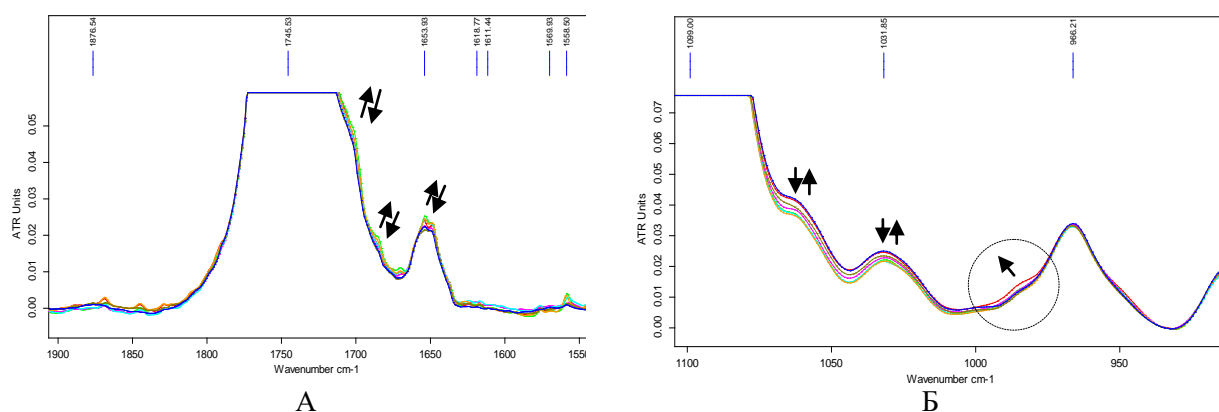


Рис. 3.4.5 Наложение ИК-спектров подсолнечных масел 2018 года производства после однократной дезодорации (1Р1Д) и при хранении в течение 6 недель в климатическом шкафу при $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, с постоянными аэрацией и освещением. А – регион $1900\text{ см}^{-1}\text{--}1600\text{ см}^{-1}$, Б – регион $1100\text{ см}^{-1}\text{--}920\text{ см}^{-1}$. Синий – масло до хранения (1Д0Н), оливковый – 1Д1Н, оранжевый – 1Д2Н, голубой – 1Д3Н, розовый – 1Д4Н, зелёный – 1Д5Н, красный – 1Д6Н. Рисунки большего формата представлены в Приложении Г.

В зоне «отпечатка пальцев» наиболее заметными были изменения интенсивности волновых чисел при 1062 см^{-1} , 1032 см^{-1} (валентное колебание эфирной $\nu(-\text{C}-\text{O}-\text{C}-)$ связи) и 986 см^{-1} (деформационное колебание конъюгированных *транс*, *транс*- и *цис*, *транс*-двойных ($-\text{C}=\text{CH}-$) связей) (рис. 3.4.5Б). Снижение интенсивности первых двух полос проходило в порядке 1Д0Н-1Д6Н-1Д1Н-1Д4Н-1Д5Н-1Д3Н-1Д2Н. Интенсивность полосы при 986 см^{-1} была примерно одинаковой во всех образцах кроме 1Д6Н.

Двухмесячное хранение в климатической камере масла после одной рафинации и двух дезодораций (1Р2Д) и последующий ИК-анализ выявили следующие изменения в спектрах, представленных на рисунке (рис. 3.4.6).

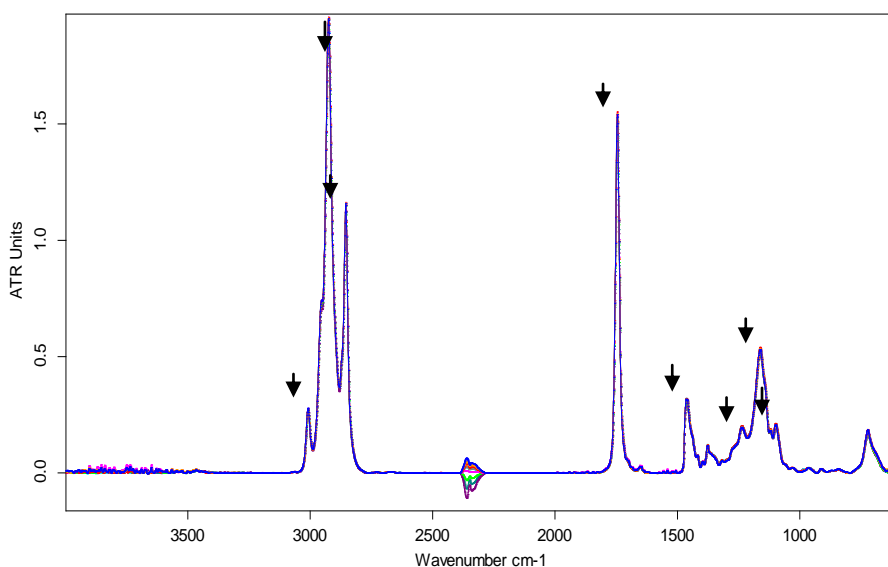


Рис. 3.4.6 Наложение ИК-спектров подсолнечных масел 2018 года производства после двукратной дезодорации (1Р2Д) и при хранении в течение 8 недель в климатическом шкафу при $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, с постоянными аэрацией и освещением. Синий – масло до хранения (2Д0Н), серый – 2Д1Н, оранжевый – 2Д2Н, красный – 2Д3Н, розовый – 2Д4Н, зелёный – 2Д5Н, голубой – 2Д6Н, оливковый – 2Д7Н, цвет морской волны – 2Д8Н.

Аналогично маслам 1Р1Д основные полосы поглощения масла 1Р2Д, а именно полосы при волновых числах 3009 см^{-1} , 2953 см^{-1} , 2954 см^{-1} , 2854 см^{-1} , 1745 см^{-1} , 1464 см^{-1} , 1237 см^{-1} , 1162 см^{-1} , 1098 см^{-1} постепенно уменьшались в интенсивности в зависимости от срока хранения масел. Также можно отметить заметно более низкую интенсивность общего спектра, который соответствовал маслу 2Р7Н (линия оливкового цвета).

Детальное рассмотрение региона 1850 см^{-1} - 1600 см^{-1} снова показывает разнонаправленное изменение интенсивности полос, характерных для свободных жирных кислот или ненасыщенных кетонов (1701 см^{-1}), ненасыщенных альдегидов (1684 см^{-1} , 1670 см^{-1}) и ненасыщенных карбонильных соединений (1653 см^{-1} и 1648 см^{-1}) (рис. 3.4.7А) (более наглядно это иллюстрировано на рисунке 3.4.10.)

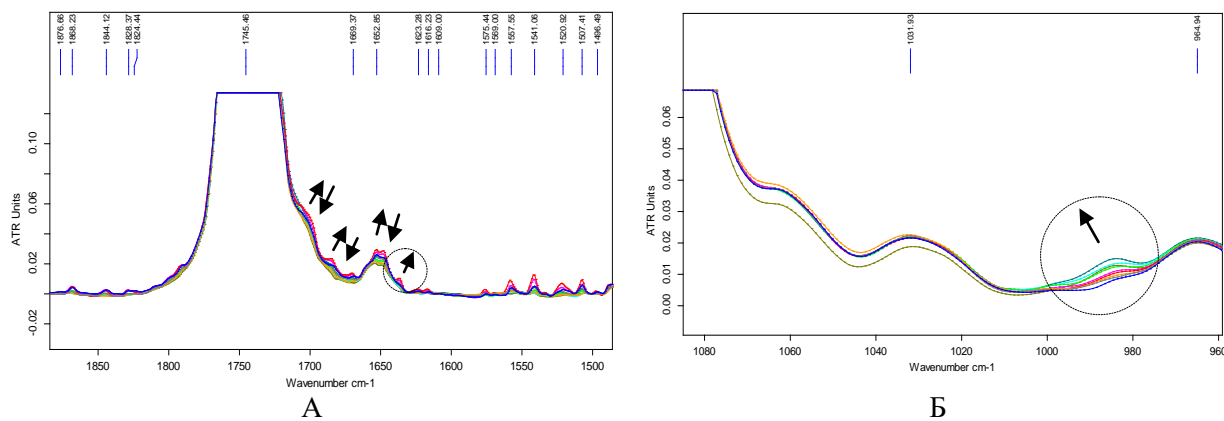


Рис. 3.4.7 Наложение ИК-спектров подсолнечных масел 2018 года производства после двухкратной дезодорации (1Р2Д) и при хранении в течение 8 недель в климатическом шкафу при 35 °С, с постоянными аэрацией и освещением. А – регион 1850 см⁻¹-1600 см⁻¹, Б – регион 1080 см⁻¹-960 см⁻¹. Синий – масло до хранения (2Д0Н), серый – 2Д1Н, оранжевый – 2Д2Н, красный – 2Д3Н, розовый – 2Д4Н, зелёный – 2Д5Н, голубой – 2Д6Н, оливковый – 2Д7Н, цвет морской волны – 2Д8Н. Рисунки большего формата представлены в Приложении Г.

Снижение интенсивности этих полос происходило в следующем порядке: 2Д3Н-2Д4Н-2Д0Н-2Д1Н-2Д8Н-2Д5Н-2Д2Н-2Д6Н-2Д7Н. Также стоит отметить увеличение интенсивности поглощения при волновом числе 1636 см⁻¹, особенно в образцах 2Р3Н и 2Р4Н, которая может свидетельствовать о колебании связи, характерной для α, β-ненасыщенных альдегидов и/или кетонов.

Наиболее важным изменением ИК-спектра повторно дезодорированного подсолнечного масла в процессе хранения можно назвать увеличение интенсивности полосы при 984 см⁻¹ с 0,008 ATR Units до 0,015 ATR Units строго с увеличением времени хранения масла в климатическом шкафу (рис. 3.4.7Б). Согласно данным литературы, эта полоса вероятнее всего относится к деформационным колебаниям конъюгированных *транс*, *транс*- и *цис*, *транс*- двойных (–C=CH–) связей. Такое же изменение, но более слабо выраженное, было обнаружено в маслах 1Р1Д, однако там волновое число было 986 см⁻¹ (рис. 3.4.5Б).

Наложённые спектры масла 1Р3Д, снятые в течение 8 недель хранения представлены на рис. 3.4.8. В отличие от масел 1Р1Д и 1Р2Д интенсивность основных полос поглощения менялась независимо от срока хранения масел 1Р3Д, а именно уменьшалась в порядке 3Д2Н-3Д3Н-3Д6Н-3Д1Н-3Д5Н-3Д0Н-3Д4Н-3Д8Н-3Д7Н:

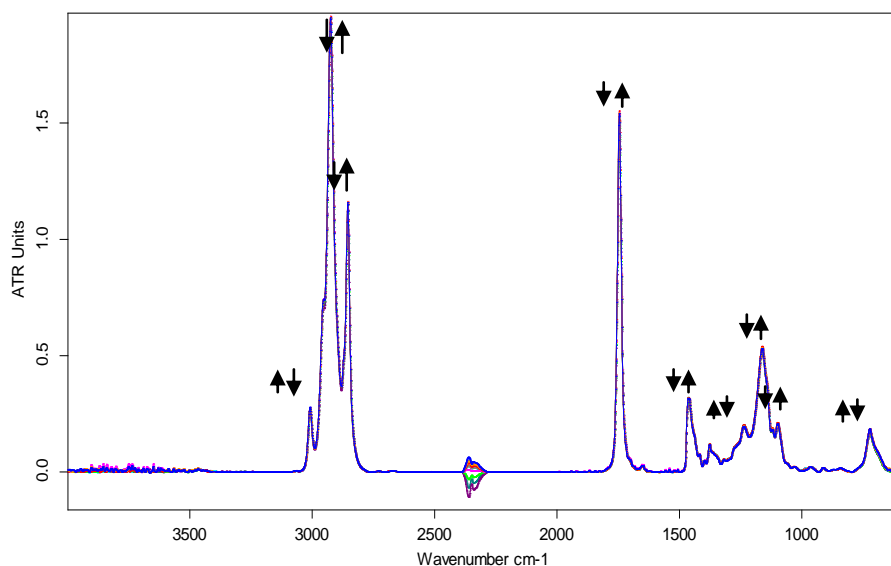


Рис. 3.4.8 Наложение ИК-спектров подсолнечных масел 2018 года производства после трёхкратной дезодорации (1РЗД) и при хранении в течение 8 недель в климатическом шкафу при 35 °С, с постоянными аэрацией и освещением. Синий – масло до хранения (ЗД0Н), жёлтый – ЗД1Н, красный – ЗД2Н, розовый – ЗД3Н, зелёный – ЗД4Н, серый – ЗД5Н, голубой – ЗД6Н, фиолетовый – ЗД7Н, цвет морской волны – ЗД8Н

Зона колебаний альдегидных, кетоновых групп и группы карбонильных соединений также изменялась в порядке, не зависящем от времени хранения масла: интенсивность колебаний при 1701 см^{-1} , 1684 см^{-1} , 1670 см^{-1} , 1653 см^{-1} , 1648 см^{-1} , 1636 см^{-1} увеличивалась в порядке ЗД8Н-ЗД7Н-ЗД6Н-ЗД2Н-ЗД4Н-ЗД1Н-ЗД0Н-ЗД5Н-ЗД3Н (рис. 3.4.9А) (более наглядно это иллюстрировано на рисунке 3.4.10.). При этом полоса при волновом числе 984 см^{-1} аналогично образцу 1Р2Д росла в строгой зависимости от длительности хранения масла с 0,009 ATR Units до 0,016 ATR Units (рис. 3.4.9Б).

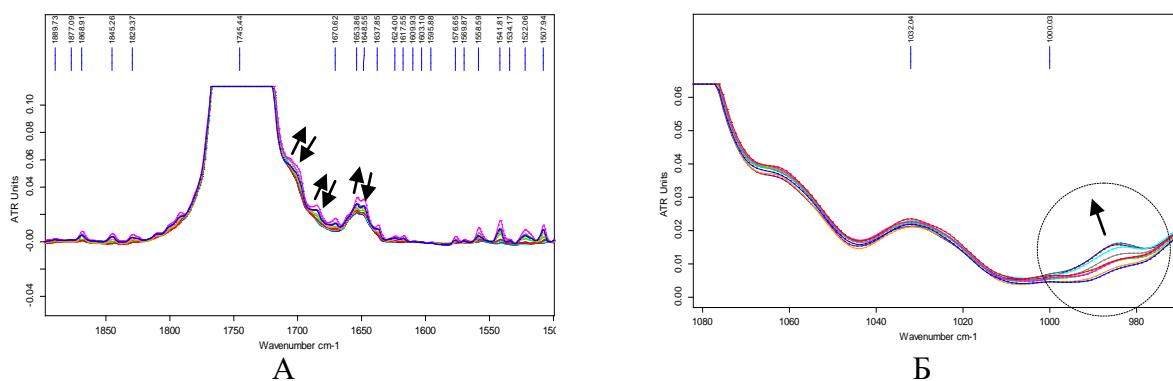


Рис. 3.4.9 Наложение ИК-спектров подсолнечных масел 2018 года производства после трёхкратной дезодорации (1РЗД) и при хранении в течение 8 недель в климатическом шкафу при 35 °С, с постоянными аэрацией и освещением. А – регион 1850 см^{-1} - 1600 см^{-1} , Б – регион 1080 см^{-1} - 970 см^{-1} . Синий – масло до хранения (ЗД0Н), жёлтый – ЗД1Н, красный – ЗД2Н, розовый – ЗД3Н, зелёный – ЗД4Н, серый – ЗД5Н, голубой – ЗД6Н, фиолетовый – ЗД7Н, цвет морской волны – ЗД8Н. Рисунки большего формата представлены в Приложении Г.

Ниже приведены графики изменения интенсивности волновых чисел, ориентировочно соответствующих свободным жирным кислотам или ненасыщенным, кетонам (1701 см^{-1}), ненасыщенным альдегидам (1684 см^{-1} , 1670 см^{-1}), ненасыщенным

карбонильным соединениям и (1653 см^{-1} и 1648 см^{-1}) и α,β -ненасыщенным альдегидам (1636 см^{-1}) (рис. 3.4.10), характерных для исследованных образцов.

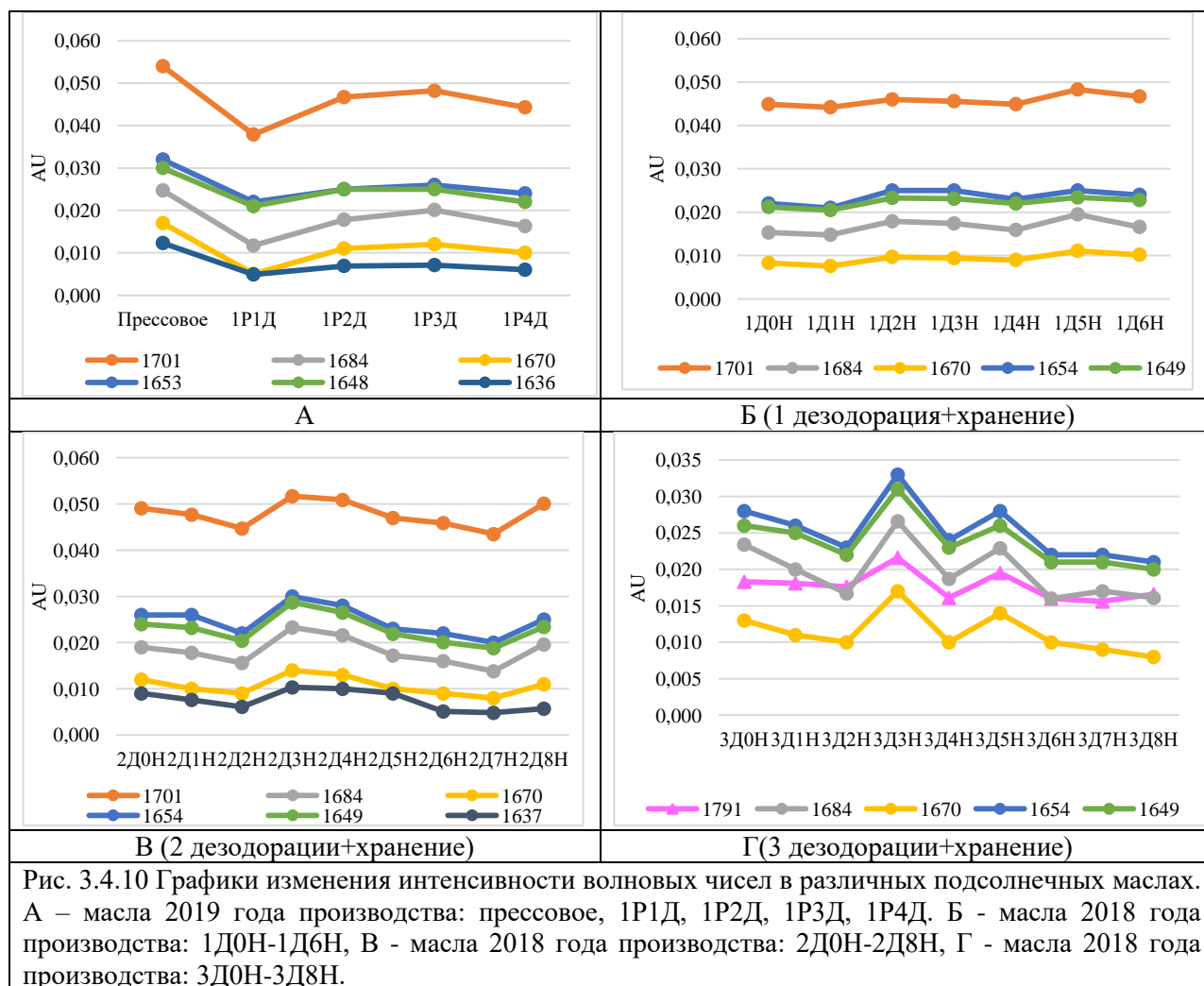


Рис. 3.4.10 Графики изменения интенсивности волновых чисел в различных подсолнечных маслах. А – масла 2019 года производства: прессовое, 1P1Д, 1P2Д, 1P3Д, 1P4Д. Б - масла 2018 года производства: 1Д0Н-1Д6Н, В - масла 2018 года производства: 2Д0Н-2Д8Н, Г - масла 2018 года производства: 3Д0Н-3Д8Н.

Таким образом, анализ ИК-спектров подсолнечных масел с различной степенью очистки и при хранении в климатическом шкафу в условиях нефорсированного окисления показал следующее. В маслах разной степени очистки наиболее значимые изменения в интенсивности проявлялись на 963 см^{-1} (изолированные *транс*, *транс*-двойные связи ($-\text{C}=\text{CH}-$)), которая сдвигалась до 965 с увеличением глубины очистки, кроме того происходило увеличение её интенсивности.

При хранении масел разной глубины очистки основные изменения были отмечены на 984 см^{-1} - 986 см^{-1} , которые предположительно соответствуют деформационным колебаниям конъюгированных *транс*, *транс*- и *цис*, *транс*- двойных ($-\text{C}=\text{CH}-$) связей. Интенсивность этих полос поглощения слабо росла в маслах 1P1Д и более заметно – в маслах 1P2Д (с $0,08\text{ ATR Units}$ до $0,15\text{ ATR Units}$) и 1P3Д (с $0,09\text{ ATR Units}$ до $0,16\text{ ATR Units}$). Колебания интенсивности полос поглощения, ориентировочно соответствующих группам вторичных продуктов окисления (ненасыщенные альдегиды, кетоны, карбонильные соединения), для каждой группы исследованных образцов имели

различные направления. Они не зависели от степени очистки и от длительности хранения подсолнечных масел в климатической камере.

3.5 Изучение летучих веществ масел методом ТФМЭ с ГХ/МС. Оптимизация условий экстракции.

Оценку изменения профиля летучих веществ и летучих вторичных продуктов окисления подсолнечных масел разной степени очистки проводили путём сорбирования летучих веществ на специальном волокне для твердофазной микроэкстракции с последующим газохроматографическим разделением адсорбированных компонентов. Идентификацию и сравнительную оценку относительного содержания летучих веществ осуществляли с помощью масс-спектрометрического и пламенно-ионизационного детекторов.

Определение летучих компонентов масел проводили в 3 этапа:

а) На первом этапе выбирали подходящее волокно для экстракции аналитов и проводили предварительное изучение состава вторичных продуктов окисления. Для этого использовали подсолнечное масло пресловое, рафинированное дезодорированное (1Р1Д) и рафинированное дезодорированное 4 раза (1Р4Д), которое подвергали форсированному окислению в течение 3 и 6 дней.

б) На втором этапе осуществляли подбор оптимальных условий экстракции аналитов путём математического планирования эксперимента, а именно построения ротатабельного центрального композиционного плана (РЦКП). Исследование проводили для подсолнечного масла рафинированного дезодорированного (1Р1Д), которое подвергали форсированному окислению в течение суток.

в) На третьем этапе изучали профиль летучих веществ и вторичные продукты окисления подсолнечных масел разной степени очистки и в процессе хранения при 35 °С, постоянном освещении и аэрации в течение 6-8 недель.

3.5.1 Подбор волокна для твердофазной микроэкстракции летучих веществ

Целью данного этапа исследования был поиск наиболее подходящего волокна, способного сорбировать соединения с разными функциональными группами и с наибольшей ёмкостью.

Анализ сорбирующей способности проводили с использованием четырёх коммерчески доступных волокон для твердофазной микроэкстракции:

- 65 мкм полидиметил/дивинилбензол (П/Д),
- 50/30 мкм дивинилбензол/карбоксен/полидиметилсилоксан (Д/К/П),
- 85 мкм карбоксен/полидиметилсилоксан (К/П),
- 85 мкм полиакрилат (П).

Для всех идентифицированных соединений проводился поиск установленного класса опасности по СанПиН 1.2.3685-21 [2] и списку канцерогенов и возможных канцерогенов человека МАИР [27]. Для летучих вторичных продуктов окисления по данным литературы устанавливали предполагаемый источник – соответствующую жирную кислоту. Полученные данные представлены в таблице 3.5.1.1, вещества сгруппированы по принадлежности к соответствующим классам:

Таблица 3.5.1.1. Список летучих соединений, идентифицированных с помощью набора волокон с покрытиями П/Д, Д/К/П, К/П и П. Образцы: подсолнечные масла пресовое, 1Р1Д, 1Р4Д, подвергавшиеся форсированному окислению в течение 3 и 6 суток. . Iк – индексы Ковача, рассчитанные по набору алканов для колонки Supelcowax 10 60 м*0,53 мм*0,1 мкм, Iк теор – известные индексы Ковача для полярных колонок интернет-ресурса PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Дата обращения 29.07.2021). RT – приведённое время удерживания.

RT	Наименование соединения	CAS номер	Индексы Ковача		Класс опасности		Вероятный предшественник	Ссылка
			Iк	Iк теор	ГН2.2.5.3532-18	МАИР		
Алканы								
0,311	Бутан	106-97-8	400	400	4		C18:2	[257]
0,427	Пентан	109-66-0	499	500			C18:2	[257, 313]
0,985	н-Гексан	110-54-3	601	600	4		Продукт действия липоксигеназы или экстрагент	[244]
2,170	Гептан	142-82-5	696	700			C18:1	[257]
4,396	Октан	111-65-9	800	800			C18:1	[257]
Алкены								
0,426	Бутен		446	426, 436, 415				
0,657	п-пентен		552	523, 532, 534			C18:3 (2-Пентен)	[313]
1,477	1-гексен	592-41-6	650	610-674			C18:2	[257, 244]
6,644	1-гептен, 3-метил-	4810-09-7	844	?				
6,970	(E)-2-октен	13389-42-9	880	852-867			C18:2	[257]
Алкадиены								
11,868	1,3-Октадиен	1002-33-1	949	954, 958			C18:3 (2,5-октадиен)	[313]
Спирты								
9,733	Этанол	64-17-5	953	883-972	4		C18:3 (окисление) Свежее масло	[313] [154]
15,337	Толуол	108-88-3	1009	1011-1091	3	3		
18,552	1-бутанол	71-36-3	1048	1094-1181	3		C18:2	[257]
22,264	1-пентанол	71-41-0	1265	1200-1294	3		C18:2	[257, 263]
29,252	1-октен-3-ол	3391-86-4	1465	1399-1487			C18:3/ C18:2	[313, 257]
29,993	1-гептанол, 4-метил-	-	1487	1973				
31,055	1-гексанол, 2-этил-	104-76-7	1521	1441-1522				

34,245	1-октанол,2-метил-	818-81-5	1623	?	3			
34,572	1-бутанол, 4-этокси-	111-73-9	1634	?				
34,806	1-нонанол 1	143-08-8	1642	1619-1698	3			
35,016	1-гептанол, 6-метил-	-	1649	1524				
35,461	(S)(+)-6-метил-1-октанол	110453-78-6	1664	?	3			
36,519	1-гептанол, 2-пропил-	10042-59-8	1698					
Кетоны								
6,096	Ацетон (2-пропанон)	67-64-1	828	832	4			
8,484	2-бутанон	78-93-3	920	866-950	4			
12,390	2,3-бутандион	431-03-8	958	955-978				
13,195	3-бутен-2-он, 3-метил-	25988-32-3	971	987-1006				
20,076	2-гептанон	110-43-0	1205	1145-1214				
22,842	3-октанон	106-68-3	1280	1205-1300	4 (2-октанон)			
24,574	(E)-1-октен-3-он	4312-99-6	1328	1270-1334			C18:2	[257]
28,475	(E)-3-октен-2-он	18402-82-9	1442	1363-1440			C18:2	[313]
Альдегиды								
2,454	Ацетальдегид	75-07-0	714	689-744	3	2В	C18:2/C18:3	[313]
4,618	Пропаналь	123-38-6	808	747-828	3		C18:2/C18:3	[313]
8,318	Бутаналь	123-72-8	880	853-911	3		C18:3	[313]
11,801	Пентаналь	110-62-3	998	929-1013			C18:2/C18:3	[257, 263]
16,071	Гексаналь	66-25-1	1120	1034-1127			C18:2	[257, 313, 244]
20,217	Гептаналь	111-71-7	1209	1148-1219			C18:2/C18:3	[257, 313, 244]
24,966	Октаналь	124-13-0	1332	1247-1349			C18:1	[257, 126]
28,583	Нонаналь	124-19-6	1437	1348-1441			C18:1	[257, 244, 126]
5,329	2-пропеналь	107-02-8	833	828-872			C18:2/C18:3	[313]
8,545	2-пропеналь, 2-метил-	78-85-3	921	883-893	2			
19,091	(E)-2-пентеналь	1576-87-0	1184	1096-1174			C18:3	[263]
21,728	(E)-2-гексеналь	6728-26-3	1251	1184-1236			C18:3	[313, 263]
25,665	(E)-2-гептеналь	18829-55-5	1359	1273-1366			C18:2/C18:1	[257, 313, 244, 48]

29,375	(E)-2-октеналь	2548-87-0	1469	1392-1468			C18:2/C18:1	[48, 257]
29,090	(E,Z)-2,4-гексадиеналь	53398-76-8	1460	1430-1480				
30,492	(E,E)-2,4-гексадиеналь	142-83-6	1502	1447-1532		2B		
31,552	(E,Z)-2,4-гептадиеналь	4313-02-4	1537	1454-1520			C18:3	[313, 244]
32,304	(E,E)-2,4-гептадиеналь	4313-03-5	1561	1447-1532				
38,407	(E,E)-2,4-нонадиеналь	5910-87-2	1766	1660-1747			C18:2	[257, 313]
40,262	(E,Z)-2,4-декадиеналь	25152-84-5	1829	1708-1792			C18:2/C18:1	[257, 263]
40,972	(E,E)-2,4-декадиеналь	25152-83-4	1859	1768-1858				
Циклические соединения								
33,671	Бензальдегид	100-52-7	1603	1470-1569	3			
1,907	Циклопентан, метил-	96-37-7	681	675				
7,749	Фуран, тетрагидро-	109-99-9	899	866-868	4	2B		
11,478	Бензол	71-43-2	992	964	2	1		
17,811	Циклогексан, пропил-	1678-92-8	1044	982-1019				
21,887	Фуран 2-пентил	3777-69-3	1255	1193-1265			C18:2	[313]
25,788	Циклогексанон	108-94-1	1363	1301	3	3		
34,853	1-метилпентил циклопропан	6976-28-9	1644	?				
33,171	4-Этилциклогексанол	4534-74-1	1588	?				
Другие								
18,393	Пентилоксиран	5063-65-0	1170	1153				
25,045	2,5-диметилгексан-2,5- дигидропероксид	3025-88-5	1136	?				
37,392	Виниловый эфир капроновой кислоты	3050-69-9	1234	?				
6,532	Этилацетат	141-78-6	860	856-917	4		Продукт взаимодействия уксусной кислоты и этанола в свежем масле	[263, 154]
Производные терпена								
13,426	α -пинен	80-56-8	1050	989-1077			Арома-профиль свежего масла	
15,237	Камфен	79-92-5	1104	1033-1115				
17,172	β -пинен	127-91-3 18172-67-3	1145	1065-1158				

17,652	Сабинен	3387-41-5	1155	1074-1156			
18,003	Вербенен	4080-46-0	1162	?			
20,837	d1-Лимонен	5989-27-5	1226	1152-1245	3		
22,632	Терпинен (γ -)	99-85-4	1274	1200-1293			
23,433	δ -3-Карен	13466-78-9	1295	1255-1300			
24,110	Стирен	100-42-5	1314	1229-1310			
23,647	Кумен	99-87-6	1300	1232-1322		2B	
35,015	Каларен	17334-55-3	1649	1544			
37,427	Изопинокарвеол	6712-79-4	1731	1632-1690			
36,356	Вербенол	473-67-6	1693	1652-1671			
37,060	Бутиролактон	96-48-0	1718	1592-1673	3	3	

? - нет данных для полярных колонок

Всего в подсолнечных маслах после трёх и шести дней интенсивного окисления с помощью всех волокон удалось зарегистрировать 123 различных соединения, из которых достоверно определены были 80 веществ.

Профиль летучих веществ окисленных масел составляли алканы, алкены, спирты насыщенные, ненасыщенные и ароматические, кетоны, в т.ч. ненасыщенные, альдегиды насыщенные, моно- и диненасыщенные, бензальдегид, фураны и другие циклические соединения, а также составляющие аромата свежего масла – различные терпеноиды и другие.

Большинство компонентов, которые можно отнести ко вторичным продуктам окисления и для которых был установлен предшественник в виде жирной кислоты, ожидаемо являлись производными линолевой (19 веществ), линоленовой (12 веществ) и олеиновой кислот (7 веществ). Некоторые из обнаруженных соединений, по данным литературы, имеют смешанное происхождение: например, 1-октен-3-ол, ацетальдегид, пропаналь и 2-пропеналь могут являться продуктами окисления как линолевой, так и линоленовой кислот [257, 313]. Другие, такие как пентан, пентаналь, гептаналь, 2-гептеналь, 2-октеналь и 2,4-декадиеналь, разные источники относят к продуктам окисления разных жирных кислот.

Большинство соединений профиля летучих веществ были зарегистрированы во всех маслах независимо от длительности окисления или степени обработки масла. Тем не менее, были и отличия. Так, на 6 день окисления в профиле летучих веществ практически не обнаруживались вещества класса терпеноидов, широкий спектр которых был зарегистрирован во всех маслах на 3 день окисления. Кроме того, на 3 день окисления во всех маслах был обнаружен 2,5-диметилгексан-2,5-дигидропероксид, который может являться одним из продуктов перекисного окисления (обнаруживался также в метанольном экстракте листьев *Melia Azedarach.*, [35]), а на шестой – бутилоксиран и виниловый эфир капроновой кислоты – предположительно продукты разложения ацилглицеридов.

Все исследованные волокна различались по способности сорбировать различные классы веществ, по количеству сорбируемых соединений, а также по ёмкости. В таблице 3.5.1.2 приведены количество идентифицированных соединений профиля летучих веществ окисленных масел, а также сумма их площадей в зависимости от типа волокна (для удобства восприятия значения представлены в виде единиц интенсивности $(abundance) \cdot 10^{-8}$, $\sum_{\text{площадей}} \cdot 10^{-8}$): К/П – волокно 85 мкм карбоксен/полидиметилсилоксан, Д/К/П - волокно 50/30 мкм дивинилбензол/карбоксен/полидиметилсилоксан, П/Д - волокно 65 мкм полидиметил/дивинилбензол, П - волокно 85 мкм полиакрилат.

Таблица 3.5.1.2 Количество идентифицированных летучих соединений и сумма их площадей* в зависимости от типа волокна и продолжительности окисления.

	3 дня окисления				6 дней окисления			
	К/П	Д/К/П	П/Д	П	К/П	Д/К/П	П/Д	П
	Сумма площадей идентифицированных летучих соединений, $\sum_{\text{площадей}} * 10^{-8}$							
прессовое	2,70	0,37	0,02	0,02	14,12	1,13	0,38	0,01
1Р1Д	0,56	0,37	0,25	0,12	2,12	0,89	0,42	0,01
4Р4Д	0,66	0,28	0,26	0,01	2,35	1,18	0,49	0,02
	Количество идентифицированных соединений							
прессовое	48	57	19	19	46	28	14	2
1Р1Д	59	59	19	13	28	27	19	2
4Р4Д	66	59	45	17	28	27	20	3

*Величины площадей получены с помощью МС-детектора.

Независимо от степени очистки масел и продолжительности окисления все волокна можно расположить в порядке уменьшения их сорбирующей способности для выбранных условий экстракции: К/П > Д/К/П > П/Д > П. При этом на всех волокнах, кроме волокна с фазой из полиакрилата, через 6 дней окисления сумма площадей всех соединений была больше (практически везде – на порядок), чем через 3 дня окисления.

Общее количество идентифицированных соединений во всех видах масел в целом было схожим для волокон К/П и Д/К/П, а также для волокон П/Д и П (3 дня окисления), причём первые два волокна были способны сорбировать в несколько раз больше соединений, чем другие два. На 6 день окисления практически не осталось летучих веществ, которые можно было бы зарегистрировать с помощью волокна из полиакрилата.

Диаграммы на рисунках 3.5.1.1 и 3.5.1.2 показывают распределение сумм площадей летучих соединений с разными функциональными группами в общей сумме площадей идентифицированных соединений в зависимости от типа волокна для масел после 3 и 6 дней окисления соответственно:

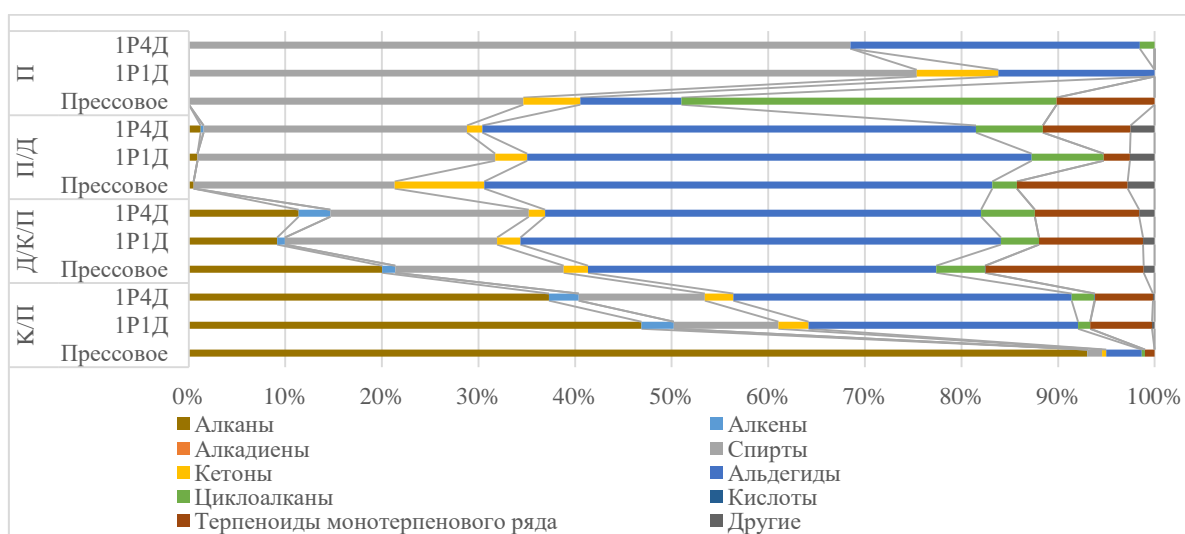


Рис. 3.5.1.1 Групповое распределение сорбированных летучих соединений подсолнечного масла для разных волокон после 3-х дней интенсивного окисления, % от $\sum_{\text{площадей}} * 10^{-8}$

(данные МСД).

Как показывает анализ рисунка 3.5.1.1 волокна К/П и П в некоторых случаях преимущественно сорбировали соединения только одного типа: волокно из полиакрилата сорбировало главным образом спирты и в меньшей степени альдегиды (масла 1Р1Д и 1Р4Д), сорбция остальных групп соединений не была постоянной. На волокне из карбоксен/полиакрилата в прессовом масле сорбция остальных компонентов подавлялась алканами, в маслах 1Р1Д и 1Р4Д спектр обнаруживаемых соединений был немного шире, хотя преимущественно сорбировались также алканы и альдегиды. Большим разнообразием отличались волокна Д/К/П и П/Д – так, с помощью волокна Д/К/П удалось зарегистрировать 8-9 из 10 установленных типов соединений (все типы масла), волокном П/Д - 7/10 (прессовое масло и масло 1Р1Д) и 8/10 (масло 1Р4Д).

Спектр сорбируемых компонентов масла после 6 дней окисления был более равномерным для всех волокон (рисунок 3.5.1.2):

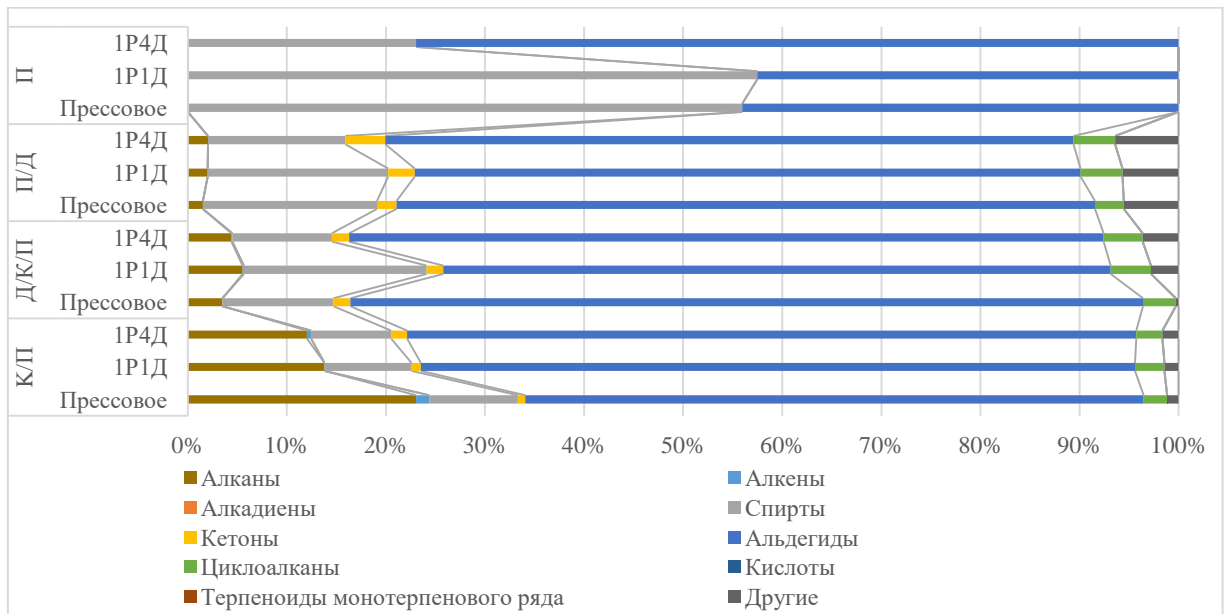


Рис. 3.5.1.2 Групповое распределение сорбированных летучих соединений подсолнечного масла для разных волокон после 6-ти дней интенсивного окисления, % от $\sum \text{площадей} \cdot 10^{-8}$ (данные МСД).

На этой стадии окисления на все волокна в основном сорбировались соединения с альдегидной группой, а также спирты, алканы, циклоалканы и продукты разложения ацилглицеридов, такие как виниловый эфир капроновой кислоты. Используя волокна К/П и Д/К/П удалось обнаружить 7 из 10 идентифицированных групп соединений (все типы масел), с помощью волокна П/Д было зарегистрировано 6 из 10 групп соединений. Волокно из полиакрилата после экстракции во всех образцах содержало только спирты и альдегиды.

Количество сорбируемых волокнами видов соединений варьировало в зависимости от типа волокна и количества очисток подсолнечного масла. Во всех случаях больше

всего обнаруживалось альдегидов, спиртов, терпеноидов и кетонов, наибольшее количество соединений адсорбировалось волокнами К/П, Д/К/П (все типы масел) и П/Д (масло 1Р4Д) (рисунок 3.5.1.3):

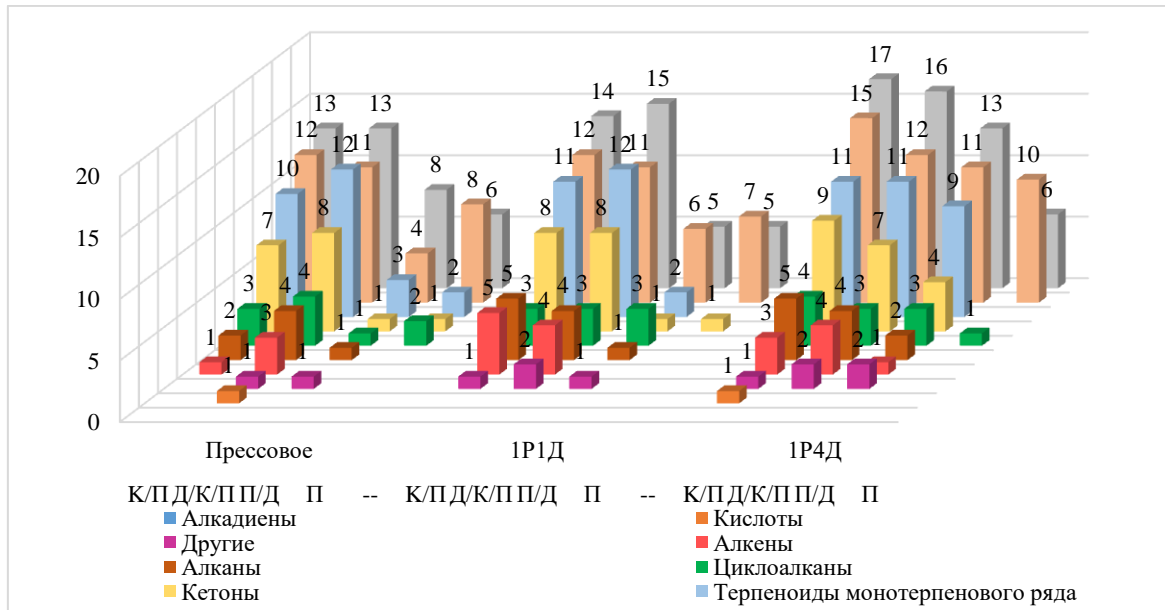


Рис. 3.5.1.3 Количество сорбируемых разными волокнами летучих соединений после 3-х дней интенсивного окисления в зависимости от типа очистки подсолнечного масла.

Волокно из полиакрилата показало худшую способность сорбировать разные классы соединений.

После 6 дней окисления больше всего соединений было обнаружено с помощью тех же волокон К/П, Д/К/П и П/Д (все типы масел), причём по сравнению с остальными немного больше соединений сорбировалось на волокне К/П, особенно в прессовом масле (рисунок 3.5.1.4):

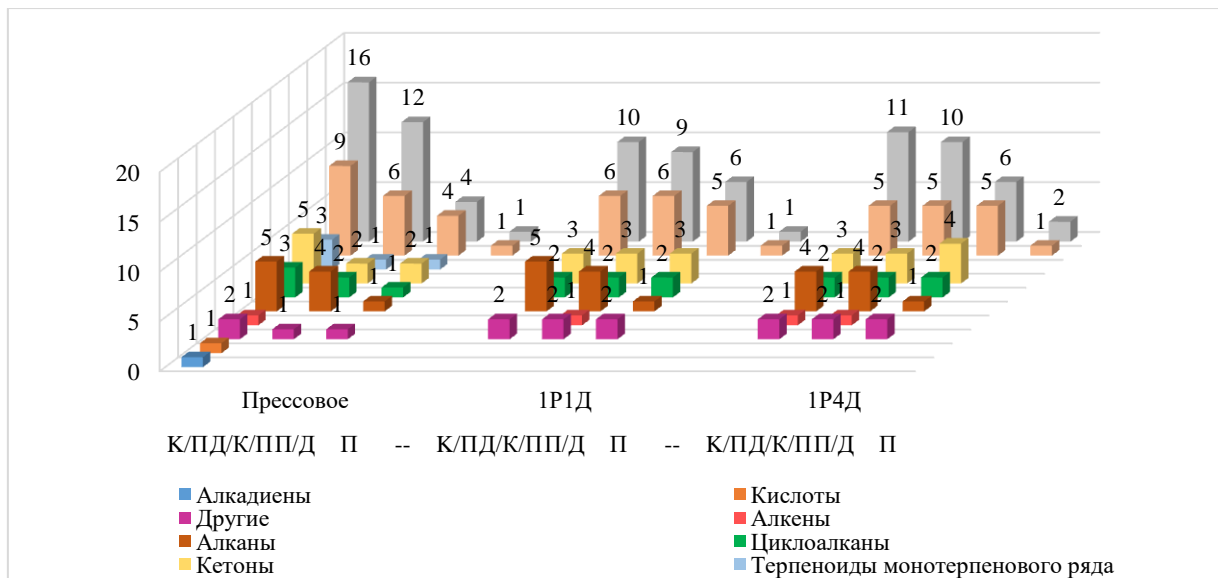


Рис. 3.5.1.4 Количество сорбируемых разными волокнами летучих соединений после 6-ти дней интенсивного окисления в зависимости от типа очистки подсолнечного масла.

Используя волокно из полиакрилата, удалось зарегистрировать всего три соединения – 1-октен-3-ол, 2-октеналь (все масла) и 2,4-декадиеналь (масло 1Р4Д).

Таким образом, наиболее подходящими волокнами для изучения летучих веществ подсолнечных масел могут быть волокна К/П, Д/К/П и П/Д. Однако, при исследовании масел разной степени очистки наиболее стабильные результаты показало волокно Д/К/П:

- оно являлось вторым по величине сорбированных соединений (общая сумма площадей идентифицированных соединений, таблица 3.5.1.2);
- в маслах после 3-х и 6-ти дней окисления это волокно сорбировало наибольшее количество разных функциональных групп без преимущественной сорбции какого-либо одного типа соединений (рисунки 3.5.1.1 и 3.5.1.2);
- количество найденных с помощью этого волокна веществ в каждой группе было одним из самых больших (рисунки 3.5.1.3 и 3.5.1.4).

Исходя из поставленной цели для дальнейшего исследования было выбрано волокно 50/30 мкм дивинилбензол/карбоксен/полидиметилсилоксан (Д/К/П).

3.5.2 Оптимизация параметров экстракции летучих веществ

Целью данного этапа исследования было установить оптимальные условия экстракции летучих соединений подсолнечных масел с помощью волокна Д/К/П.

Для этого из списка идентифицированных компонентов (таблица 3.5.1.1) отбирали продукты окисления жирных кислот (почти все альдегиды, некоторые кетоны и спирты), вещества, характеризующие свежее масло (этанол, этилацетат, α -пинен) и некоторые другие по принципу наибольшей адсорбции на волокне Д/К/П (с интенсивностью на хроматограммах более 10^6 единиц интенсивности), а также по наличию установленного класса опасности:

- от 3 класса и выше (вещества умеренно опасные, 3 группа, вещества высоко опасные, 2 группа, и чрезвычайно опасные, 1 группа) согласно СанПиН 1.2.3685-21,
- от класса 2В и выше (возможные канцерогены для человека, 2В, вероятные канцерогены человека, 2А, и вещества с установленной канцерогенностью, 1 группа) согласно списку МАИР.

Таким образом было отобрано 48 летучих соединений. Среди них 4 алкана, 8 спиртов (включая бензол, 1 класс опасности, МАИР), 7 кетонов, 19 альдегидов (включая ацетальдегид, 2В класс, 2 класс (СанПиН 1.2.3685-21), 2,4-гексадиеналь (2В класс), 3 циклоалкана и другие. Полный список отобранных соединений представлен в таблице 3.5.2.1.

Таблица 3.5.2.1 – Список летучих веществ, использованных для построения РЦКП. RT – приведённое время удерживания, мин.

RT	Алканы	RT	Альдегиды	RT	Кетоны
0,427	Пентан	2,454	Ацетальдегид	6,096	Ацетон
0,985	н-Гексан	4,618	Пропаналь	12,390	2,3-бутандион
2,170	Гептан	5,329	2-Пропеналь	20,076	2-гептанон
4,396	Октан	8,318	Бутаналь	24,574	(E)-1-октен-3-он
RT	Алкены	11,801	Пентаналь	25,788	Циклогексанон
0,657	1(2)-Пентен	16,071	Гексаналь	28,475	(E)-3-октен-2-он
RT	Спирты	19,091	(E)-2-пентеналь	37,060	бутиролактон
11,478	Бензол	20,217	Гептаналь	RT	Циклоалканы
15,337	Толуол	21,728	(E)-2-гексеналь	17,811	Циклогексан, пропил-
18,552	1-бутанол	25,665	(E)-2-гептеналь	21,887	Фуран 2-пентил
22,264	1-пентанол	29,090	(E,Z)-2,4-гексадиеналь	34,853	1-метилпентил циклопропан
29,252	1-октен-3-ол	30,492	(E,E)-2,4-гексадиеналь	RT	Вещества свежего масла
31,055	1-гексанол, 2-этил-	29,375	(E)-2-октеналь	6,532	Этилацетат
34,245	1-октанол, 2-метил-	31,552	(E,Z)-2,4-гептадиеналь	9,733	Этанол
35,461	(S) - (+) - 6-метил-1-октанол	32,304	(E,E)-2,4-гептадиеналь	13,426	α -Пинен
		33,671	Бензальдегид	RT	Другие
		38,407	(E,E)-2,4-нонадиеналь		Бутилоксиран
		40,262	(E,Z)-2,4-декадиеналь	25,045	2,5-диметилгексан-2,5-дигидропероксид
		40,972	(E,E)-2,4-декадиеналь	37,392	Виниловый эфир капроновой кислоты

Оптимизацию условий экстракции представленных соединений осуществляли методом планирования эксперимента, в частности путём построения ротатабельного центрального композиционного плана (РЦКП). Для этого было выбрано 4 наиболее значимых фактора:

- температура нагрева образца ($T_{\text{эксп}}$, °C), фактор А
- длительность экспозиции волокна над образцом ($t_{\text{эксп}}$, мин), фактор В
- температура десорбции аналитов в инжекторе или температура инжектора ($T_{\text{дес}}$, °C), фактор С
- время десорбции ($t_{\text{дес}}$, мин), фактор D

Уровни варьирования факторов устанавливали согласно таблице 2.4.4.1, а эксперимент проводили в соответствии с планом, приведённым в таблице 2.4.4.2 Материалов и методов.

Поиск оптимальных условий экстракции проводили сразу для нескольких типов откликов: общая сумма площадей выбранных веществ и их количество, общая сумма площадей альдегидов и их количество, общая сумма площадей спиртов, общая сумма площадей кетонов и сумма площадей наиболее опасных соединений (классы опасности I, 2 ПВ). Таким образом был проведён 31 анализ в рандомизированном порядке, результаты которого представлены в таблице 3.5.2.3.

Таблица 3.5.2.3– Суммарная площадь соответствующих групп соединений в единицах интенсивности ПИД, эквивалентных рА.

№ опыта	Общая сумма площадей	Общее количество соединений, n	Сумма площадей альдегидов	Количество альдегидов, n	Сумма площадей соединений с классами опасности	Сумма площадей спиртов	Сумма площадей кетонов
1	35498437	24	3607696	9	305745	939279	424685
2	40210735	25	4044226	9	346553	1091518	473793
3	48370468	22	5244758	8	368090	1298657	782221
4	67818741	26	10347633	9	587498	2260623	1004748
5	36826311	24	3371195	8	261209	977043	400979
6	37006660	26	3663993	9	314531	969716	447924
7	47315263	27	5691520	10	514713	1616100	701917
8	59081232	27	8099404	10	572604	1875684	818622
9	31615523	22	2345934	7	220134	891669	335363
10	31123405	22	2462442	7	174785	732976	314800
11	52286782	23	5426935	9	421400	1615491	558355
12	56787709	26	7655255	10	523195	1833945	718671
13	36301374	25	3643664	9	310672	1052755	479352
14	48486977	26	5715090	9	426500	1249207	586244
15	50599349	25	6114241	9	456785	1567410	679296
16	64560179	27	9231423	10	637914	2096937	933712
17	55845307	25	10569587	9	1736853	2055230	804276
18	27226750	25	2291327	9	326781	821134	332255
19	55103983	27	8380149	10	682957	2211358	753751
20	20083605	21	1935762	7	139526	595078	276051
21	43356725	25	4367396	8	417203	1295417	436381
22	49473041	25	4201867	8	376941	1353558	369627
23	41421747	26	4926569	9	271041	1243867	522052
24	47073077	24	6573200	8	439311	1632827	554246
25	41131392	24	4986048	8	247443	1214053	509465
26	44025061	24	5073970	8	270076	1287482	563220
27	42959287	22	4671774	6	278312	1324191	533711
28	42383452	25	5251013	8	266080	1271717	541793
29	43860026	25	5156659	8	271493	1308363	554880
30	48736767	27	6230384	10	416658	1464083	595229
31	49346956	26	6199529	9	366384	1406916	543467

Используя полученные данные строили модели поверхностей отклика для каждой группы соединений в зависимости от варьируемых условий ТФМЭ. Они представлены на рисунке 3.5.2.1.

Дисперсионный анализ (ANOVA) показал, что все подобранные модели можно считать достоверными при $p < 0,05$, отсутствие согласия всех моделей – не значимым ($p > 0,05$), а квадрат коэффициента корреляции удовлетворительным для таких моделей, как «Сумма площадей всех соединений», «Альдегиды общие, сумма площадей», «Группы 1,2,2б, сумма площадей».

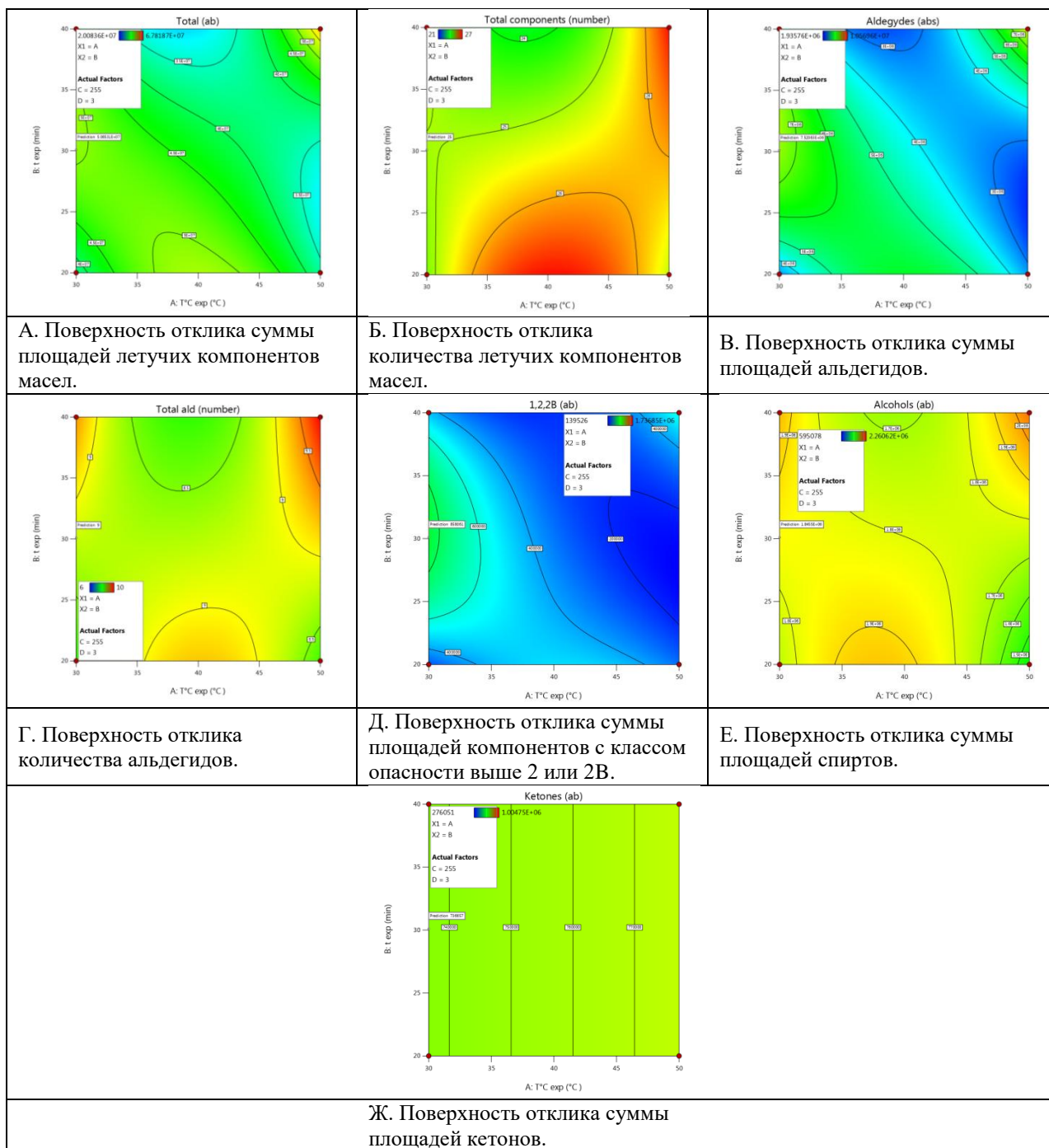


Рис. 3.5.2.1. Графическое изображение поверхностей откликов моделей. Ось абсцисс – температура образца подсолнечного масла, ось ординат – длительность экспозиции. Температура десорбции=255°C, время десорбции = 3 минуты. Изменение цвета характеризует изменение отклика от наименьшего значения (синий цвет) к наибольшему (красный цвет).

Невысокий R^2 моделей «Количество соединений» и «Количество альдегидов» объясняется тем, что поверхности откликов строятся главным образом из нецелых значений, тогда как исходные данные (количество соединений) могут быть только целыми числами. Значения R^2 моделей «Спирты общие, сумма площадей» и «Кетоны общие, сумма площадей» обусловлены присутствием выбросов среди исходных данных (таблица 3.5.2.4):

Таблица 3.5.2.4 – Уравнения и статистические параметры моделей зависимости сумм площадей и количеств летучих компонентов подсолнечных масел от условий ТФМЭ-анализа.

Вид отклика	Уравнение модели	Значимость модели *	Отсутствие согласия модели**	R ^{2***}	Значимые условия*
Сумма площадей всех соединений	$Y_1 = -828557892 + 29027955 \cdot X_1 + 15634055 \cdot X_2 + 1229548 \cdot X_3 + 42097938 \cdot X_4 - 27701 \cdot X_1 \cdot X_2 - 31648 \cdot X_1 \cdot X_3 - 1552880 \cdot X_1 \cdot X_4 - 9950 \cdot X_2 \cdot X_3 + 255863 \cdot X_2 \cdot X_4 - 203341 \cdot X_3 \cdot X_4 - 167817 \cdot X_1^2 + 212585 \cdot X_2^2 - 6110 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_4 + 7156 \cdot X_1 \cdot X_3 \cdot X_4 - 7485 \cdot X_1^2 \cdot X_2 - 22837 \cdot X_1 \cdot X_2^2 + 426 \cdot X_1^2 \cdot X_2^2$	<0,0001	0,8998	0,9743	A, B, C, AB, BC, CD, B ² , ACD, A ² B, AB ² , A ² B ²
Количество соединений	$Y_{\Sigma n} = -78,223 + 4,845 \cdot X_1 + 3,025 \cdot X_2 + 0,047 \cdot X_3 - 0,1619 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,0610 \cdot X_1^2 + 0,0021 \cdot X_1^2 \cdot X_2$	0,0048	0,8388	0,514	B, C, A ² B
Альдегиды общие, сумма площадей	$Y_{\Sigma ald} = -333815000 + 10784300 \cdot X_1 + 12433400 \cdot X_2 + 747374 \cdot X_3 + 3012160 \cdot X_4 - 450785 \cdot X_1 \cdot X_2 - 5917 \cdot X_1 \cdot X_3 - 84784 \cdot X_1 \cdot X_4 - 28121 \cdot X_3 \cdot X_4 - 87457 \cdot X_1^2 - 122825 \cdot X_2^2 - 1241 \cdot X_3^2 + 1184 \cdot X_1 \cdot X_3 \cdot X_4 + 3421 \cdot X_1^2 \cdot X_2 - 2519 \cdot X_1^2 \cdot X_4 + 3055 \cdot X_1 \cdot X_2$	<0,0001	0,5037	0,9622	A, B, AB, CD, A ² , C ² , ACD, A ² B, AB ²
Количество альдегидов	$Y_{\Sigma n ald} = +18,7610 + 2,7809 \cdot X_1 - 0,1875 \cdot X_2 - 0,2542 \cdot X_3 - 13,4583 \cdot X_4 - 0,0988 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,0083 \cdot X_2 \cdot X_3 + 0,4125 \cdot X_2 \cdot X_4 + 0,0542 \cdot X_3 \cdot X_4 - 0,0350 \cdot X_1^2 - 0,0017 \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot X_4 + 0,0013 \cdot X_1^2 \cdot X_2$	0,0364	0,9925	0,5945	B, BCD, A ² B
Группы 1,2,2б, сумма площадей	$Y_{\Sigma haz} = -38240000 + 1642700 \cdot X_1 + 2486550 \cdot X_2 - 102000 \cdot X_1 \cdot X_2 - 16592 \cdot X_1^2 - 35341 \cdot X_2^2 + 980 \cdot X_1^2 \cdot X_2 + 1379 \cdot X_1 \cdot X_2^2 - 12 \cdot X_1^2 \cdot X_2^2$	<0,0001	0,3721	0,9522	A, B, A ² , A ² B, AB ² , A ² B ²
Спирты общие, сумма площадей	$Y_{\Sigma Ale} = -16173300 + 771717 \cdot X_1 + 155073 \cdot X_2 + 16279 \cdot X_3 + 2343030 \cdot X_4 - 25749 \cdot X_1 \cdot X_2 + 1281 \cdot X_2 \cdot X_3 - 9864 \cdot X_3 \cdot X_4 - 10109 \cdot X_1^2 + 335 \cdot X_1^2 \cdot X_2$	0,0118	0,9584	0,5848	B, BC, CD, A ² B
Кетоны общие, сумма площадей	$Y_{\Sigma ket} = -13406400 + 213100 \cdot X_1 + 56646 \cdot X_3 + 3420150 \cdot X_4 - 841 \cdot X_1 \cdot X_3 - 61414 \cdot X_1 \cdot X_4 - 13886 \cdot X_3 \cdot X_4 + 245 \cdot X_1 \cdot X_3 \cdot X_4$	0,0163	0,9224	0,493	CD

*Значимость при $p < 0,05$

**Отсутствие согласия (lack of fit) считалось не значимым при $p > 0,05$

***R² - квадрат коэффициента корреляции модели

При анализе данных таблицы 3.5.2.4 можно сделать вывод о значимости фактора продолжительности экспозиции волокна над образцом (В) практически для всех моделей. Температура нагрева образца (фактора А) оказывала влияние на общую сумму площадей летучих веществ, а также отдельно альдегидов и соединений с установленным классом опасности. Температура инжектора (фактор С) влияла на общую сумму площадей летучих веществ, а также их количество. В некоторых случаях важным оказалось взаимодействие температуры и продолжительности экстракции, причём в разных соотношениях (АВ, А²В, АВ², А²В²). В идеале эти два параметра должны быть подобраны таким образом, чтобы можно было достичь равновесия между концентрациями веществ на волокне и в паровой фазе вокруг него [287]. Фактор D (время десорбции) напрямую на отклики влияния не оказывал. В целом, полученные данные согласуются с предыдущими исследованиями [206].

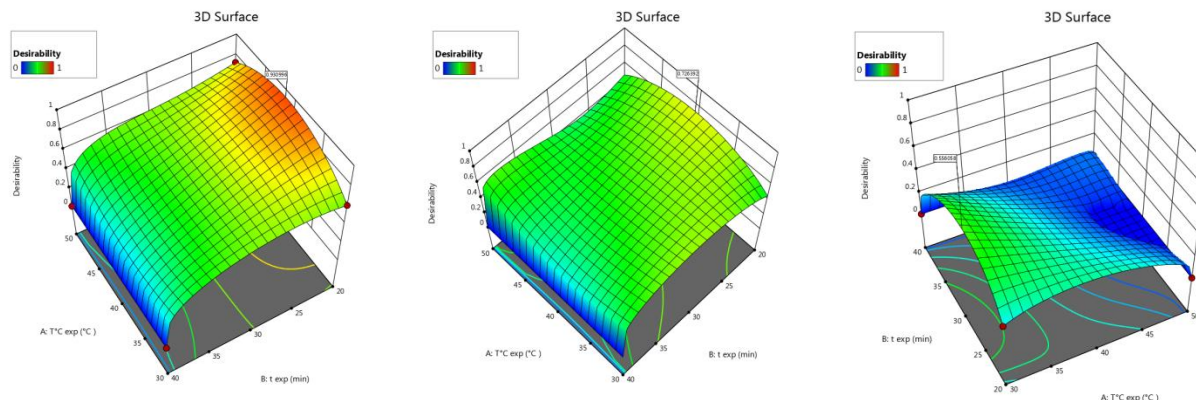
Полученные модели использовали для построения т.н. профилей желательности – поверхностей отклика, полученных с помощью РЦКП при оптимизации условий для соответствующего отклика. Для этого определили основные критерии желательности: получение максимально возможного отклика при минимальной продолжительности экстракции. При этом температура нагрева образца, температура инжектора и длительность нахождения волокна в инжекторе не должны выходить за пределы установленных диапазонов. Эти условия отражены в таблице 3.5.2.5. Для упрощения подбора оптимальных условий все отклики были объединены в 3 группы:

Таблица 3.5.2.5- Критерии построения графика профиля желательности для максимально возможного извлечения летучих компонентов масел.

Параметры ТФМЭ-анализа				
Тип фактора		Критерий желательности	Нижний предел	Верхний предел
Тэксп, °С		Значение в установленном диапазоне	30	50
t эксп, мин		Минимально возможное значение	20	40
Тдес, °С		Значение в установленном диапазоне	225	255
t дес, мин		Значение в установленном диапазоне	3	7
Вид отклика				
1. Общее количество соединений	Сумма площадей всех соединений	Максимально возможное в заданных условиях значение	20083600	67818700
	Количество соединений, n		21	27
2. Вторичные продукты окисления	Альдегиды общие, сумма площадей		1935760	10569600
	Количество альдегидов, n		6	10
	Спирты общие, сумма площадей		595078	2260620
	Кетоны общие, сумма		276051	1004750

	площадей		
3. Соединения с высоким классом опасности	Бензол и производные, сумма площадей	139526	1736850
	Группы 1,2,2б, сумма площадей	139526	1736850

На рисунке 3.5.2.2 представлены полученные методом РЦКП профили желательности для трёх групп откликов:



А. Профиль желательности для максимально возможного извлечения летучих компонентов масел.

Б. Профиль желательности для максимально возможного извлечения вторичных продуктов окисления подсолнечных масел

В. Профиль желательности для максимально возможного извлечения соединений с классом опасности выше 2 или 2В

Рис. 3.5.2.2 Графическое изображение моделей поверхностей отклика, полученных с помощью РЦКП при оптимизации условий ТФМЭ. Ось абсцисс – температура образца масла, ось ординат – длительность экстракции аналитов. Температура десорбции=255°C, время десорбции = 7 минут.

Согласно полученным графикам, были определены общие оптимальные значения и условия для извлечения аналитов методов ТФМЭ в пределах изученного диапазона факторов:

- Максимальное извлечение летучих компонентов масел: $T_{\text{эксп}}$, 40 °С, $t_{\text{эксп}}$, 20 мин, $T_{\text{дес}}$, 255 °С, $t_{\text{дес}}$, 3 мин
- Максимальное извлечение вторичных продуктов окисления подсолнечных масел: $T_{\text{эксп}}$, 40 °С, $t_{\text{эксп}}$, 20 мин, $T_{\text{дес}}$, 255 °С, $t_{\text{дес}}$, 3 мин
- Максимальное извлечение соединений с классом опасности выше 2 или 2В: $T_{\text{эксп}}$, 30 °С, $t_{\text{эксп}}$, 28 мин, $T_{\text{дес}}$, 255 °С, $t_{\text{дес}}$, 3 мин

3.6 Характеристика летучих веществ подсолнечных масел разной очистки методом ТФМЭ с ГХ-МС/ПВД

Изучение летучих веществ подсолнечных масел проводили в 2020 году на образцах подсолнечных масел разной степени очистки, а именно пресловом, масле рафинированном дезодорированном 1 раз, 2 раза, 3 раза и 4 раза. Образцы были произведены в 2019 году и хранились в морозильной камере при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (в виалах из тёмного стекла под крышкой с септой, без доступа воздуха). Целью данного раздела было описание и сравнительная характеристика летучих веществ исследованных образцов. Для сравнения использовали площади пиков, полученные с помощью ПВДа и массовую долю суммарных площадей отдельных групп соединений в общей сумме идентифицированных соединений. Количественный анализ соединений душистой фракции масел не проводили из-за большого разнообразия аналитов и необходимых стандартов. Приведение здесь данных литературы по содержанию отдельных веществ летучей фракции подсолнечных масел также представляется неуместным ввиду того, что это содержание не является постоянным, а зависит от условий получения и хранения образцов, а также от условий анализа [241].

Оценка влияния длительного хранения на спектр летучих соединений подсолнечного масла приведена в разделе 3.8.3.

Изучение летучих веществ подсолнечных масел осуществляли методом ТФМЭ-ГХ/МС-ПВД, условия проведения которого были предварительно подобраны с помощью построения профиля желательности (см. пункт 3.5 Главы 3). Рисунок 3.6.1 демонстрирует хроматограммы компонентов, которые были экстрагированы из фазы над пресловым подсолнечным маслом и маслом, которое было рафинировано и дезодорировано 4 раза (1Р4Д). Буквами на хроматограммах отмечены основные и совпадающие пики; вещества, не относящиеся к образцу (компоненты фазы волокна, растворители и др.), а также вещества, которые не удалось идентифицировать, приведены без времён удерживания.

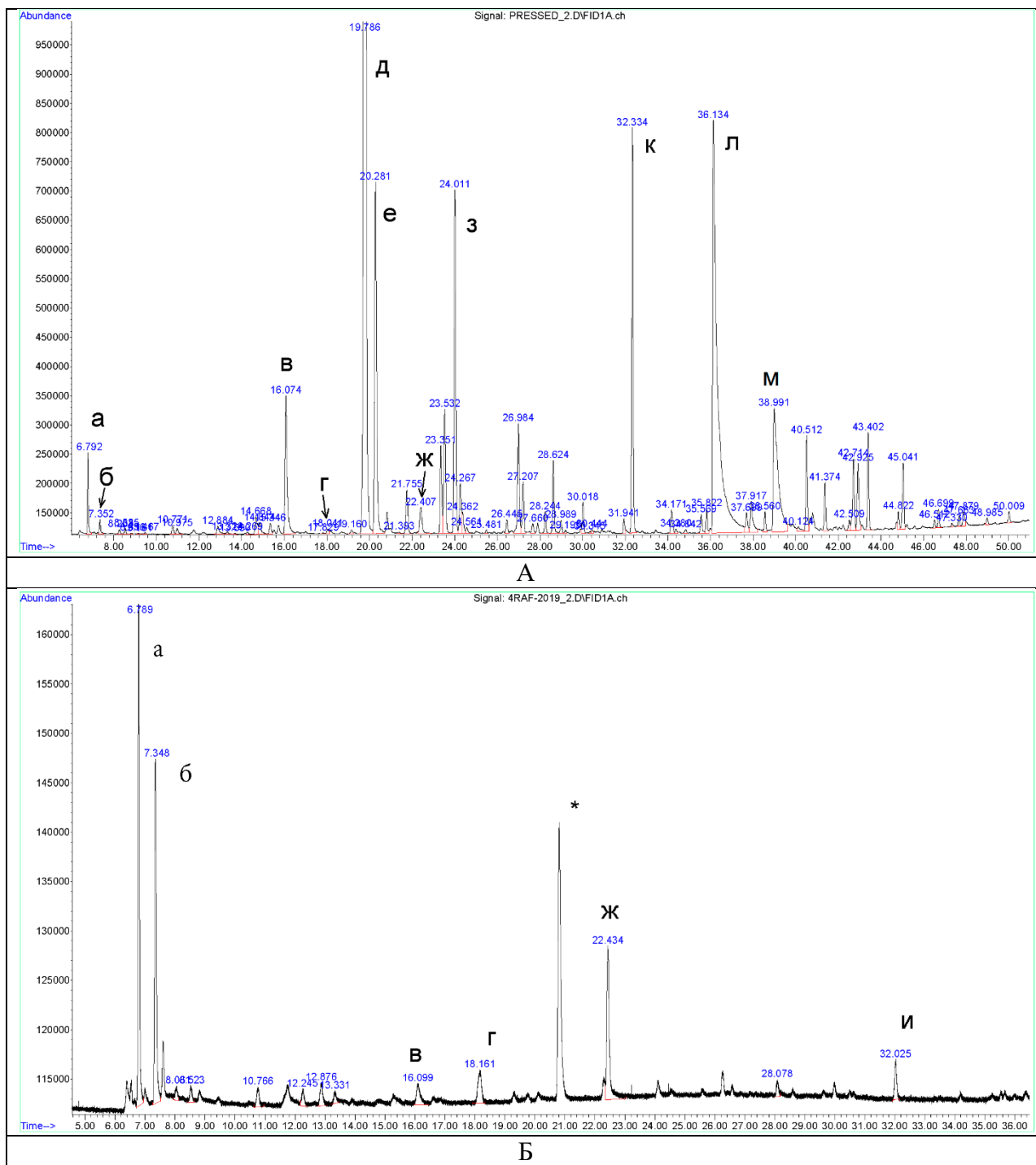


Рис. 3.6.1 Хроматограммы профиля летучих веществ подсолнечных масел прессового (А) и 1Р4Д (Б), произведённых в 2019 году. а – пентан, б – гексан, в – этанол, г – пентаналь, д – α -пинен, е – 1-пропанол, ж – гексаналь, з – сабинен, и – (*E*)-2-гептеналь, к – 1-гексанол, л – уксусная кислота, м – пропановая кислота, * - хлороформ.

В первую очередь следует отметить заметную разницу в спектре летучих соединений неочищенного и очищенного образцов: так, аромат прессового масла (рис. 3.6.1А) составляла большая группа разных классов соединений, основными из которых являлись производные терпена (α -пинен и сабинен), кислоты (уксусная и пропановая), спирты (этанол, 1-пропанол, 1-гексанол). Хроматограмма масла 1Р4Д (рис. 3.6.1Б) приведена в качестве примера, характеризующего в целом все исследованные очищенные

масла (1P1Д-1P4Д). Аромат этих масел составляли практически всегда одни и те же соединения: это были в основном алканы (пентан, гексан) и альдегиды (пентаналь, гексаналь, (*E*)-2-гептеналь). Различия заключались только в площадях пиков (таблица 3.6.1).

Таблица 3.6.1 Характеристика летучих веществ, обнаруженных в подсолнечных маслах разной степени очистки. Результаты представлены в виде средней площади из 2 параллельных измерений (данные по ПИД). Для удобства восприятия значения умножены на 10^{-7} . Ик – индексы Ковача, рассчитанные по коммерческому набору алканов для колонки Supelcowax 10 60 м*0,53 мм*0,1 мкм, Ик теор – известные индексы Ковача для полярных колонок интернет-ресурса PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Поиск соответствия аромата осуществляли по <http://www.thegoodscentscompany.com/index.html>. RT – приведённое время удерживания.

Название	CAS	Ик	Ик теор	Аромат	RT	Прессовое	1P1Д	1P2Д	1P3Д	1P4Д	Источ- ник	
Алканы (сумма)							0,73	0,77	0,31	0,30	0,40	
Пентан	109-66-0	499	500		0,43	0,41	0,02	0,14	0,18	0,16	18:1/ 18:2	
Гексан	110-54-3	601	600		0,99	0,22	0,74	0,16	0,11	0,23		
Гептан	142-82-5	696	700	сладкий, эфирный	2,17	0,02	-	0,00 ¹	0,00 ¹	0,00 ¹	18:1	
Октан	111-65-9	800	800	бензиновый	4,40	0,08	0,01	0,01	0,00 ¹	0,00 ¹	18:1	
Алкены (сумма)							0,16	0,12	0,03	0,02	0,02	
1-гептен ²	592-76-7	749	731-748		0,66	0,01	-	-	-	-	18:2	
1-октен	111-66-0	851	822-892	бензиновый	5,99	-	0,03	0,01	0,00 ¹	0,01		
(Z)-2-октен	7642-04-8	868	862-882		6,51	0,12	0,07	0,02	0,01	0,01	18:2	
(E)-2-октен ²	13389-42-9	880	852-867		6,97	0,03	0,01	0,01	0,01	0,00		
Спирты (сумма)							11,56	0,04	0,01	0,02	0,02	
Этанол	64-17-5	939	883-972		9,73	1,63	0,04	0,01	0,02	0,02		
1-пропанол	71-23-8	1064	988-1086	спиртовой, ферментированный, сивушный, плесневый	13,92	3,75	-	-	-	-		
2-метилпропанол	78-83-1	1119	1043-1129	эфирный, винный, коры	16,05	0,35						
2-пропен-1-ол	107-18-6	1141	1097-1167	острый, горчичный	16,99	0,39						
2-метилбутанол	137-32-6	1220	1158-1244	жареный, винный, луковый, фруктовый, сивушный, спиртовой, виски	20,62	1,09						
1-пентанол	71-41-0	1265	1200-1294	сивушный, масел, сладкий	22,26	0,62					18:2	
1-гексанол ²	111-27-3	1368	1308-1349	эфирный, сивушный, масляный, фруктовый, спиртовой, сладкий, свежести	25,98	3,16						
1-гептанол	111-70-6	1419	1405-1484	затхлый, листьев, фиалки, травяной, зелёный, сладкий, древесный, пиона	29,46	0,19						
Кетоны (сумма)							0,36	0,01				
2-бутанон	78-93-3	915	866-950	ацетоновый, эфирный, фруктовый, камфорный	8,48	0,24						
2-пентанон	107-87-9	971	938-1015	сладкий, фруктовый, эфирный, вина, банановый, древесный	11,68	0,07						
2-гептанон	110-43-0	1205	1145-1214	фруктовый, пряный, сладкий, травяной, кокосовый, древесный	20,08		0,01					
3-октанон	106-68-3	1280	1205-1300	свежий, травяной, лавандовый,	22,84	0,04						

2-октанон	111-13-7	1310	1262-1310	сладкий, грибной землистый, древесный, травяной,	23,97	0,01	0,00 ¹					
Альдегиды (сумма)						0,23	0,14	0,09	0,13	0,15		
в т.ч. α,β-ненасыщенные						0,03						
Ацетальдегид	4124-63-4	714	689-744	капустный	2,45		0,01	0,01	0,01	0,00 ¹	18:2/ 18:3	
пропаналь	123-38-6	808	747-828	земляной, спиртовой, винный, виски, какао, ореховый	4,62	0,04					18:2/ 18:3	
2-метилбутаналь	96-17-3	925	880-963	затхлый, какао, кофе, ореховый	8,99	0,13						
Пентаналь	110-62-3	998	929-1013	ферментированный, хлебный, фруктовый, ореховый, ягодный	11,80		0,01	0,02	0,02	0,03	18:2/ 18:3	
Гексаналь	66-25-1	1120	1034-1127	травяной, масляный	16,07		0,06	0,04	0,08	0,09	18:2	
Гептаналь	111-71-7	1209	1148-1219	масляный, цитрусовый, прогорклый	20,22		0,03				18:2/ 18:3	
(Е)-2-гексеналь ²	6728-26-3	1251	1184-1236	сладкий, миндальный, фруктовый, свежий, листьев, яблока, слив, растительный	21,73				0,01	0,01	18:3	
(Е)-2-гептеналь	18829-55-5	1359	1273-1366	свежести, жирный	25,67		0,02	0,01	0,02	0,02	18:1/ 18:2	
(Е,Е)-2,4- декадиеналь ²	2363-88-4	1859	1768-1858	апельсина, сладкий, свежий, цитрусовый, жирный, свежести	40,97	0,03					18:1/ 18:2	
Циклические соединения (сумма)						0,49						
Метилциклопентан ²	96-37-7	681	675		1,91	0,04						
Циклогексан	110-82-7	734	712-766		2,80	0,01						
3-метил-фуран	930-27-8	889	832-901		7,33	0,01						
2-пентилфуран	3777-69-3	1255	1193-1265	фруктовый, зелени, землистый, ореховый, растительный, металлический	21,89	0,18						
2-фуранметанол	98-00-0	1687	1613-1698	спиртовой, химический, затхлый, сладкий, карамельный, хлебный, кофе	36,15	0,09						
Бензиловый спирт ²	100-51-6	1920	1821-1919	цветочный, розы, фенольный, бальзамический	42,62	0,06						
Бензолэтанол ²	60-12-8	1959	1856-1956	цветочный, розы, сушёной розы, цветочный, розовой воды	43,65	0,10						
Кислоты (сумма)						14,60						
Уксусная	64-19-7	1481	1400-1498	резкий, едкий, кислый, уксусный	29,77	11,16						
Пропановая	79-09-4	1571	1474-1486	острый, кислый, сырный, уксусный	32,63	3,27						
Гексановая	142-62-1	1879	1797-1885	кислый, жирный, сырный	41,52	0,17						
Производные терпена (сумма)						40,81	0,01					
Трициклен	508-32-7	1031	993-1047		12,80	0,04						
α-пинен	80-56-8	1050	989-1077	свежий, камфоры, сладкий, сосновый,	13,43	28,50						

земляной, древесный							
Производное терпена	471-84-1	1095			15,04	0,04	
Камфен	79-92-5	1104	1033-1115	древесный, травяной, пихтовый, камфорный, терпеновый	15,24	0,44	
β-пинен	127-91-3	1145	1065-1158	сухой, древесный, свежий, сосновый, сена, свежести, смолистый	17,17	1,62	
Сабинен	3387-41-5	1155	1074-1156	древесный, терпеновый, цитрусовый, сосновый, специй	17,65	3,05	
?	36262-09-6	1160			17,91	0,49	
Вербенен	4080-46-0	1162	?		18,00	0,19	
β-мирцен	123-35-3	1185	1113-1192	перечный, терпеновый, острый, бальзамический, пластика	19,12	0,02	
Производное терпена		1205			20,09	0,12	
Лимонен	138-86-3	1226	1152-1245	цитрусовый, травяной, терпеновый, камфоры	20,84	0,46	0,01
Эвкалиптол	470-82-6	1239	1167-1253	эвкалипта, травяной, камфорный, лекарственный	21,30	0,11	
γ-терпинен	99-85-4	1274	1200-1293	маслянистый, древесный, терпеновый, лимона, лайма, тропических трав	22,63	0,11	
Кумен	99-87-6	1300	1232-1322	свежий, цитрусовый, терпеновый, древесный, специй	23,65	0,28	
Производное терпена		1313			24,09	0,05	
α-пинен эпоксид ²	1686-14-2	1421	1345-1384	свежести	27,81	0,21	
Производное терпена		1464			29,21	0,17	
Камфоленаль	4501-58-0	1537	1439-1793	травяной, свежести, древесный, янтарный, листовой	31,56	0,43	
Вербенол 1		1557			32,20	0,17	
Вербенол 2		1620		бальзамический	34,15	0,77	
Каларен ²	17334-55-3	1649	1544		35,01	0,41	
Вербенол 3		1693		свежий, сосновый, озоновый	36,36	0,70	
Пинокарвеол ²	5947-36-4	1700	1632-1690	камфорный, древесно-сосновый, бальзамический	36,56	0,67	
Вербенол 4		1717		бальзамический	37,04	0,75	
?		1768			38,46	0,15	
Вербенон ²		1775	1676-1742	камфоры, ментола, сельдерея	38,68	0,56	
?		1828	?		40,15	0,06	
Миртенол ²		1835	1747-1831	камфоры, ментола, сельдерея	40,34	0,15	

Транс-карвеол	1197-07-5	1871	1801-1884	мятный, растворителя, тмина	41,31	0,08	
Другие (сумма)						0,20	0,01
Этилацетат	103-45-7	902	856-917	цветочный, розовый, сладкий, медовый, фруктовый, тропический	7,91	0,02	0,01
2,5-диметилпиразин	123-32-0	1357	1274-1358	какао, жареных орехов, ростбифа, древесный, травы, запах лекарств	25,58	0,12	
2-этил-5-метилпиразин	13360-64-0	1428	1341-1432	кофейных зёрен, ореховый, травяной, жареный	28,03	0,03	
Триметилпиразин ²	14667-55-1	1442	1341-1432	ореховой кожуры, землистый, какао, запечённого картофеля, жареного арахиса, фундука, затхлый	28,48	0,03	

¹Площадь компонента $<0,005 \cdot 10^{-7}$

²Все представленные в таблице соединения были идентифицированы с коэффициентом совпадения с библиотечным спектром >700 . Тем не менее, для соединений, помеченных цифрой «2» расчётные индексы Ковача не всегда совпадали с эталонными диапазонами, что может быть связано в том числе с недостаточностью литературных данных по их удерживанию на полярных колонках.

Одним из немногих классов соединений, характеризующих душистую фракцию очищенных подсолнечных масел были альдегиды, в число которых входили главным образом пентаналь, гексаналь и (*E*)-2-гептеналь. Интересно, что ни одного из этих соединений не было обнаружено в прессовом масле: его основными альдегидами были 2-пропеналь, 2-метилбутаналь и (*E,E*)-2,4-декадиеналь. Ацетальдегид, который был найден среди альдегидов всех очищенных масел, имеет статус «возможных канцерогенов человека» (группы 2А и 2В соответственно). Несмотря на то, что абсолютная сумма площадей альдегидов в прессовом масле была больше, чем во всех остальных маслах, их доля относительно суммы площадей всех остальных летучих соединений составила всего 0,4%. Для сравнения процентное содержание альдегидной группы в общей сумме летучих веществ в маслах 1Р1Д-1Р4Д составило 12,4%, 19,8%, 27,2% и 25,3% соответственно (см. рис. 3.6.2).

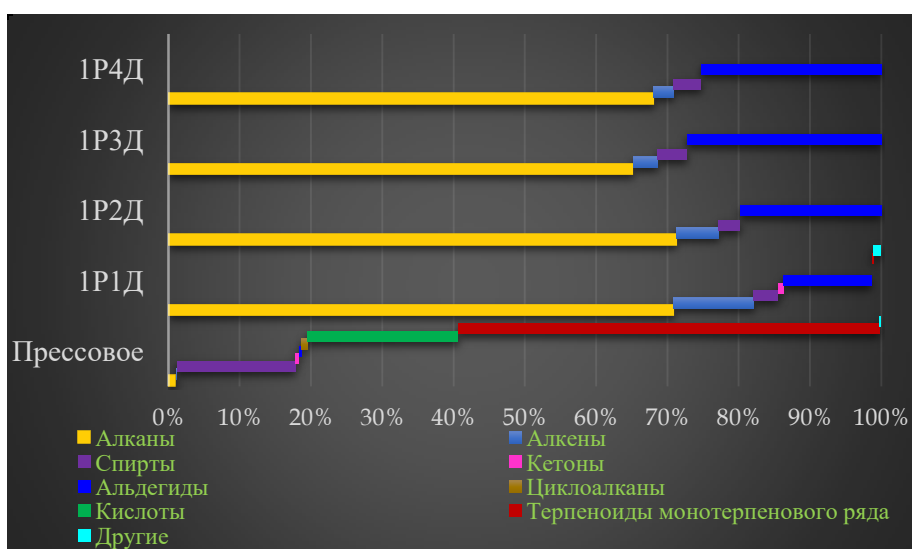


Рис. 3.6.2 Соотношение групп летучих веществ подсолнечных масел в общей сумме идентифицированных летучих веществ.

Согласно таблице 3.6.1, единственными группами соединений, которые присутствовали и в очищенных, и в неочищенном маслах были алканы и алкены. Во всех маслах основным из *алканов* можно считать пентан, поскольку он является продуктом разложения олеиновой или линолевой кислот [257, 313]. Также были обнаружены гептан и октан, которые, предположительно, образовались при разложении олеиновой кислоты [257]. Гексан в исследованных образцах мог иметь смешанное происхождение: например, он мог образоваться под действием липоксигеназы (только прессовое масло) [244], присутствовать в образцах, если имело место применение этого растворителя при производстве (экстрагирование), а также он мог попасть на ТФМЭ-волокно из атмосферного воздуха лаборатории при проведении анализа.

Доля *алкенов* согласно рис. 3.6.2 выросла с 0,1% в прессовом масле до 11,2% в масле 1Р1Д, причём главным образом за счёт содержания 1-октена и (*Z*)-2-октена;

последний предположительно является продуктом разложения линолевой кислоты [257]. Последующие дезодорации постепенно снизили количество алкенов до 2,8% от общей суммы летучих соединений.

Одним из значимых отличительных признаков свежего неочищенного масла от рафинированных стало присутствие спиртов, кислот, и монотерпеноидов (табл. 3.6.1). Этанол присутствовал во всех исследованных образцах, однако его содержание в прессовом масле было в несколько десятков раз больше, и это соответствует данным авторов [154]. Значимую долю спиртов исследованного прессового масла составляли также 1-пропанол, 2-метилбутанол и 1-гексанол. Примечательно, что один из основных продуктов распада линолевой кислоты под действием 13/12 алкоксильного радикала [114] - 1-пентанол - был найден в относительно небольшом количестве.

Доля кислот от суммы летучих веществ в прессовом подсолнечном масле составила 21,2% (рис. 3.6.2). Основными из них были короткоцепочечные уксусная (16,7%) и пропановая (4,2%) кислоты, образование которых происходит при технологической обработке масличных семян [264]. Присутствие гексановой кислоты может говорить о наличии процесса распада гексаналя [313], однако эта кислота была найдена только в прессовом масле, где доля гексаналя составила всего 5,9% идентифицированных летучих веществ. Для сравнения после технологической очистки его содержание росло вплоть до 16,0% от суммы идентифицированных летучих веществ в масле 1P4Д.

Наиболее многочисленной группой характерных для летучих веществ прессового масла соединений были монотерпеноиды, доля которых в общей сумме идентифицированных летучих веществ составила 59,2%. В исследованном образце были найдены ациклические (β -мирцен), моноциклические и бициклические монотерпены, а также один трициклический сесквитерпен - каларен. Самыми большими по площади были пики α -пинена (41,4% от суммы летучих в-в), сабинена (4,4%), β -пинена (2,4%), трёх форм вербенола (1,1%, 1,1%, 1,0%) и пинокарвеола (1,0%), что в целом похоже на результаты предыдущих исследований [54, 187].

Отдельно стоит отметить присутствие в прессовом масле продуктов реакции Майяра, а именно 2,5-диметилпиразина, 2-этил-5-метилпиразина и триметилпиразина. Эти соединения обычно характерны для душистого профиля обжаренных продуктов (например кофе, орехов) и предположительно могли появиться в процессе экстракции подсолнечного масла из семян, если имела место высокотемпературная обработка сырья (например, сушка).

По сравнению с предыдущими исследованиями характерных летучих продуктов окисления подсолнечных масел [248, 120] в исследованных нами маслах основного

эксперимента отсутствовали некоторые соединения, такие как 1-октен-3-ол, октаналь, 3-октен-2-он, 2-октеналь, нонаналь, 2-деценаль.

3.7 Изменение летучих веществ подсолнечных масел разной очистки при хранении

Хранение образцов осуществляли на протяжении 6-8 недель хранения в климатическом шкафу при 35 °С, на свету и с доступом кислорода. Условия хранения были выбраны так, чтобы происходило формирование соединений, характерных для естественного (нефорсированного) режима окисления при комнатной температуре в прозрачной таре. При этом для небольшого ускорения данного процесса была выбрана температура 35 °С.

Анализ паровой фазы подсолнечного масла 1Р1Д 2018 года в течение 6 недель хранения показал невысокое разнообразие летучих веществ и не чёткие изменения в профиле идентифицированных групп аналитов. Так, в исследованном масле не были обнаружены алкены, кетоны и α,β -ненасыщенные альдегиды. Циклические соединения были найдены только в 2 из 6 исследованных образцов. Во всех образцах был обнаружен гексан; другие алканы, такие как пентан, гептан и октан были найдены не во всех образцах. Количество обнаруженного гексана было на несколько порядков выше содержания остальных алканов, а также распределено не равномерно, что может быть связано с загрязнением им волокна или образца. Анализируя динамику остальных идентифицированных веществ в течение 6 недель можно отметить рост содержания спиртов в 3,9 раза по сравнению с начальным значением, которые были представлены этанолом, 1-пентанолом, 1-октен-3-олом, 1-гептанолом, этилгексанолом, а также гексановой кислоты (рост в 4,6 раза) и суммарного содержания dL-лимонена и p-кумена (в 12 раз) (рис. 3.7.1А и В).

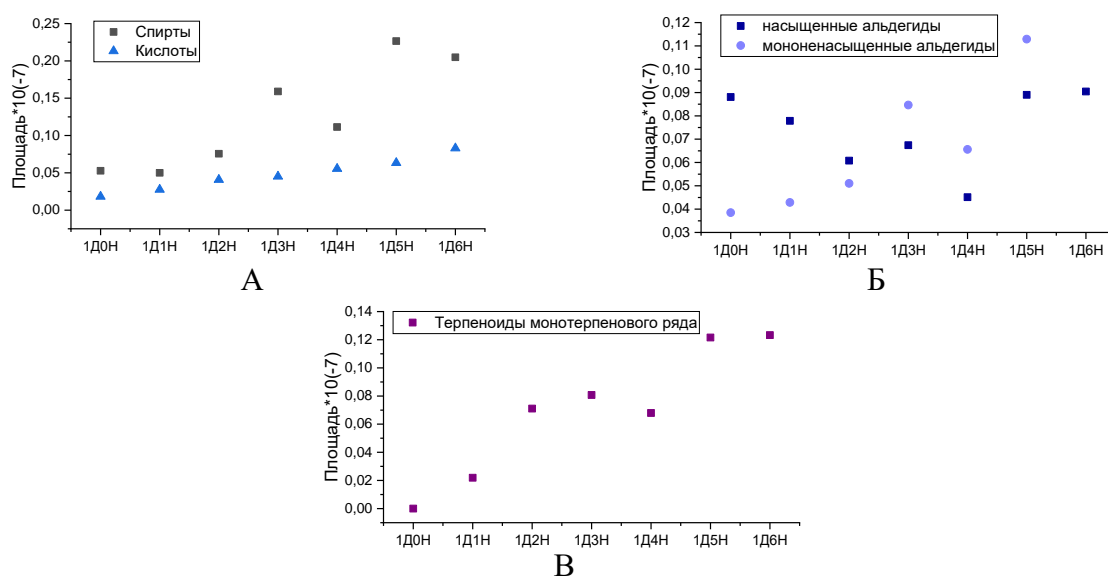


Рис. 3.7.1 Динамика площадей (аб) летучих продуктов окисления подсолнечного масла 2018 года после 1 цикла рафинации и 1 цикла дезодорации при хранении в климатическом шкафу в течение 6 недель. Значения представлены в виде площадей пиков* 10^{-7}

Среди вторичных продуктов окисления наблюдался прирост в группе мононенасыщенных альдегидов, которая в масле 1Р1Д была представлена (*E*)-2-октеналем и (*E*)-2-гептеналем: их содержание к 6 неделе выросло в 3,4 раза. Количество насыщенных альдегидов - пентанала и гексанала – в данных условиях хранения образцов оставалось практически неизменным.

Профиль летучих веществ масла 1Р2Д 2018 года сразу после очистки и до начала хранения в климатической камере содержал большее по сравнению с маслом 1Р1Д 2018 года количество групп летучих соединений. Так, можно отметить наличие алканов и алкенов, которые во всех 8 образцах были представлены пентаном, гексаном, гептаном, октаном, а также *n*-пентеном, 1-гексеном, 1-гептеном, 1-октеном, (*Z*)-2-октеном, (*E*)-2-октеном и *n*-октеном. В процессе хранения масла 1Р2Д в климатическом шкафу содержание этих веществ снизилось через 8 недель в 4 раза относительно начального значения (рис. 3.7.2А)

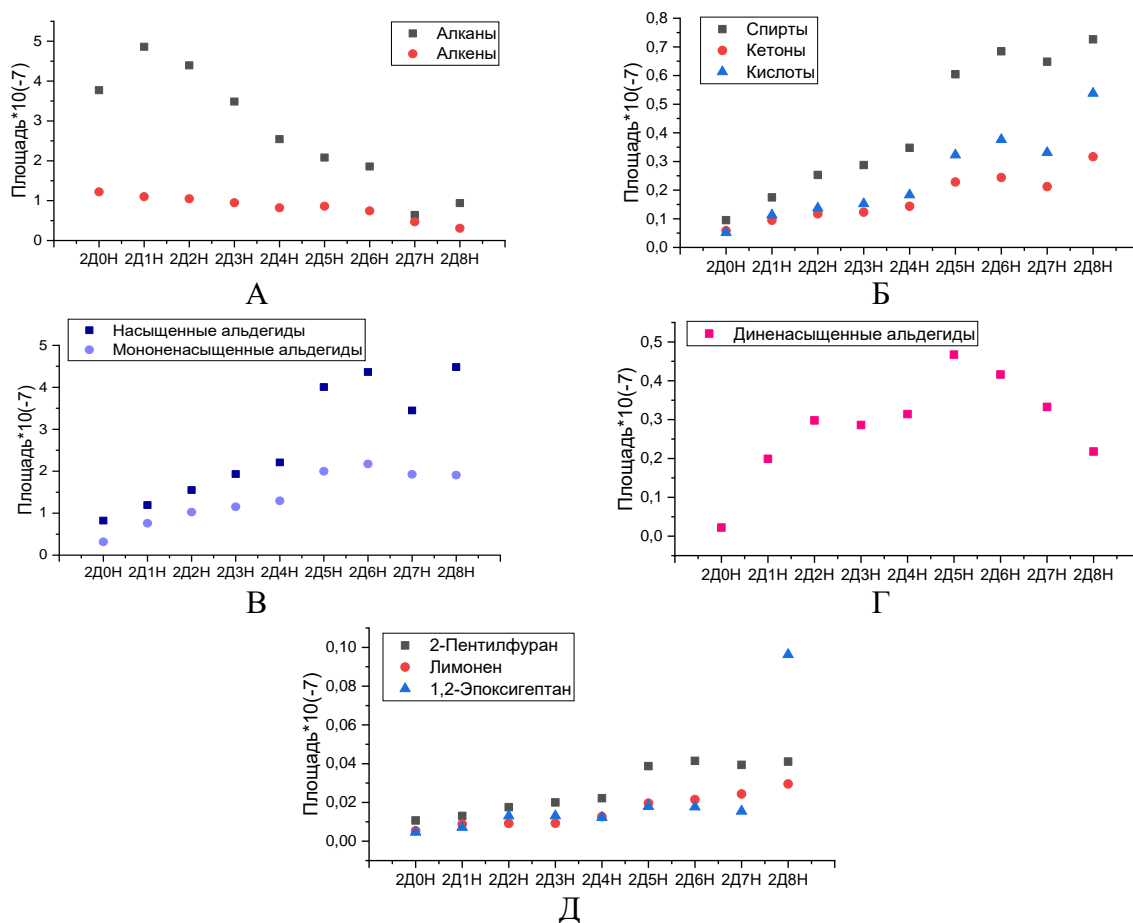


Рис. 3.7.2 Динамика площадей летучих продуктов окисления подсолнечного масла 2018 года после 1 цикла рафинации и 2 циклов дезодорации при хранении в климатическом шкафу в течение 8 недель. Значения представлены в виде площадей пиков* 10^{-7}

Содержание остальных идентифицированных компонентов росло с увеличением срока хранения. Наиболее интенсивно увеличивались кислоты (в 10,5 раза в масле 2Д8Н по сравнению с 2Д0Н, рис. 3.7.2Б), α,β -ненасыщенные альдегиды (в 9,8 раза, рис. 3.7.2Г) и спирты (в 7,6 раза, рис. 3.7.2Б). Спирты в масле 1Р2Д состояли из 1-пентен-3-ла, 1-пентанола, 1-гексанола, 1-октен-3-ола, группа кислот была представлена пентановой и гексановой кислотами.

В отличие от масла 1Р1Д в масле после двух циклов дезодорации были найдены новые продукты вторичного окисления. Например, были обнаружены такие кетоны как 2-гептанон, 2-октанон, 1-октен-3-он, (*E*)-3-октен-2-он, (*E,E*)-3,5-октадиен-2-он, а также несколько α,β -ненасыщенных альдегидов – (*E,E*)-2,4-гептадиеналь, 2,4-октадиеналь, (*E,Z*)-2,4-декадиеналь, (*E,E*)-2,4-декадиеналь. Интересно, что два последних изомера содержались во всех исследованных образцах масла 1Р2Д примерно поровну (рис. 3.7.3):

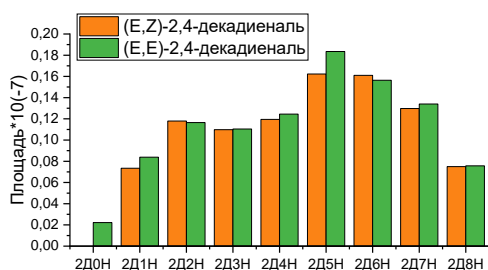


Рис. 3.7.3 Сравнение содержания изомеров 2,4-декадиеняля.

В исследованиях, где подсолнечное масло подвергали более интенсивному окислению (например, при 70-80 °С в течение 9-14 дней), отношение (*E,Z*)-изомера к (*E,E*)-изомеру было 1:2,3-5,2 [248, 120]. Изучение летучих веществ подсолнечного масла, хранившегося при хранении при комнатной температуре в течение более 9 лет показало, что эти изомеры соотносятся как 1:1, причём это соотношение сохраняется в течение не менее 6 лет, а затем начинает изменяться в сторону увеличения содержания полного транс-изомера [123].

Динамика содержания диненасыщенных альдегидов показала, что наибольшее их количество достигалось к 5 неделе хранения, а затем шло на спад (рис. 3.7.3). Возможно, это связано с фотохимически индуцированным окислением вещества с конъюгированными двойными связями. Поскольку в описанном эксперименте возможно дальнейшее химическое преобразование диненасыщенных альдегидов, по-видимому, происходит их равновесное накопление при наличии достаточного количества исходного соединения. После полного расходования исходного соединения для получения диненасыщенных альдегидов происходит снижение их содержание с образованием следующих продуктов. Мы не ставили перед собой задачу изучения третичных продуктов окисления липидов.

Насыщенные альдегиды масла 1Р2Д были представлены ацетальдегидом, бутаналем, пентаналем, гексаналем, гептаналем и нонаналем, мононенасыщенные – (*E*)-2-гексеналем, (*E*)-2-гептеналем, (*Z*)-2-октеналем и (*E*)-2-октеналем. Их количество стабильно росло с увеличением срока хранения масла.

Другие идентифицированные соединения, количество которых имело тенденцию к росту, относились к группам циклических (2-пентилфуран), терпеноидов (лимонен) и эпокси-соединений (1,2-эпоксигептан). Последний был обнаружен также в аромате грецкого ореха (*Juglans regia L.*) [97].

Результаты анализа изменения летучих веществ подсолнечного масла после 3 дезодораций (1Р3Д 2018 года) показали, что в целом компонентный состав и паровой фазы и динамика идентифицированных компонентов были схожи с таковыми у масла 1Р2Д 2018 года (рис. 3.7.4).

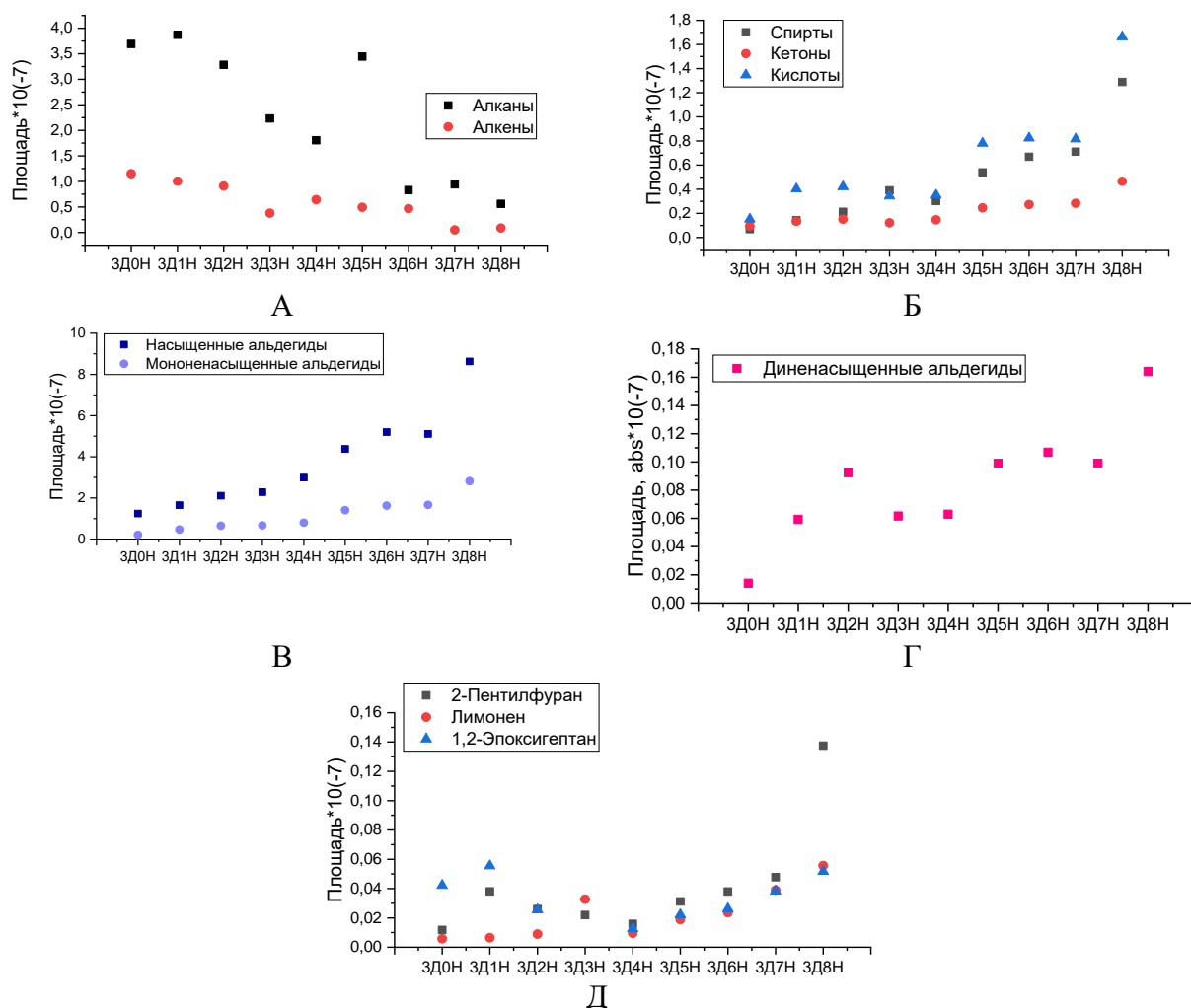


Рис. 3.7.4 Динамика площадей летучих продуктов окисления подсолнечного масла 2018 года после 1 цикла рафинации и 3 циклов дезодорации при хранении в климатическом шкафу в течение 8 недель. Значения представлены в виде площадей пиков $\cdot 10^{-7}$

Основное отличие от масел 1Р1Д и 1Р2Д состояло в том, что в масле 1Р3Д кислот было больше, чем спиртов почти на всем протяжении периода хранения (рис. 3.7.4 Б).

Кроме того, к 8 неделе в группе мононенасыщенных альдегидов добавился (*Z*)-2-гептеналь, а общее содержание диненасыщенных альдегидов имело более чёткую тенденцию к росту. Неровная динамика алканов может быть связана с загрязнением ТФМЭ-волокна гексаном.

Сравнивая развитие душистого профиля масел 1Р1Д, 1Р2Д и 1Р3Д можно отметить следующее. Содержание алкенов, спиртов и кетонов было в целом схоже в маслах 1Р2Д и 1Р3Д (различия при $p=0,05$ не значимы) и значительно ($p<0,05$) отличалось от содержания в масле 1Р1Д (рис.3.7.5А-В). Содержание кислот было различно во всех типах масел ($p<0,05$) и росло с количеством очисток и продолжительностью хранения (рис.3.7.5Г). Интересно, что судя по представленным рисункам, в процессе очистки масла спирты, кетоны и кислоты практически полностью удалялись, а затем их количество росло в процессе хранения. Алкены, напротив, появлялись в маслах непосредственно после 2-ой и 3-ей очистки и со временем удалялись из этих масел.

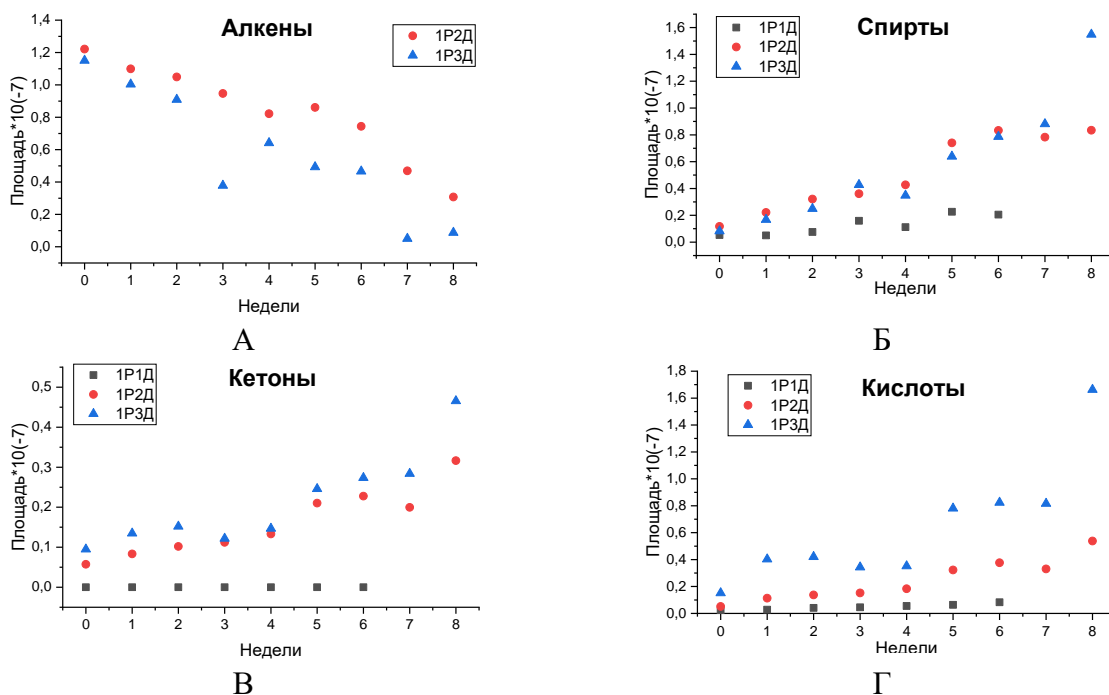


Рис. 3.7.5 Сравнение отдельных групп летучих веществ масел 1Р1Д, 1Р2Д и 1Р3Д в процессе хранения в климатической камере. Значения представлены в виде площадей пиков $\cdot 10^{-7}$

Содержание насыщенных, мононенасыщенных альдегидов и 1,2-эпоксигептана (рис. 3.7.6А, Б, Г) между очистками и в процессе хранения в климатической камере изменялось аналогично кетонам и спиртам (рис. 3.7.5 Б,В). Статистически значимые отличия в этих группах летучих веществ наблюдались между маслом 1Р1Д и маслами 1Р2Д и 1Р3Д ($p<0,05$).

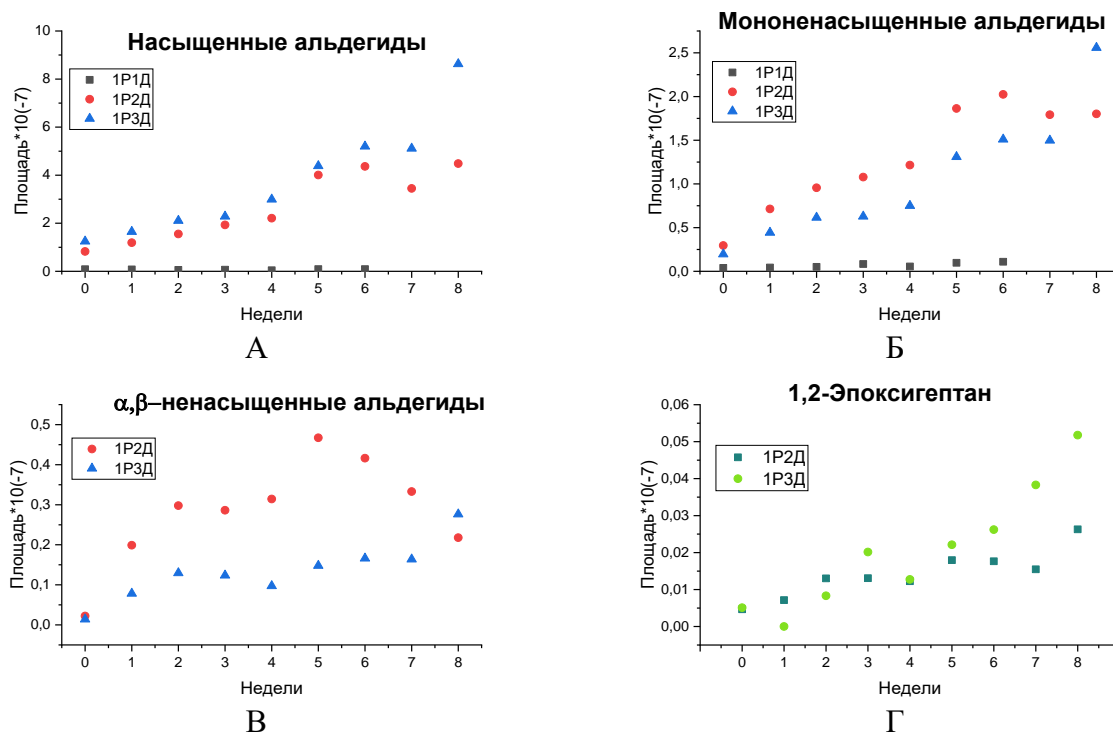


Рис. 3.7.6 Сравнение содержания различных альдегидов и 1,2-эпоксигептана в маслах 1P1Д, 1P2Д и 1P3Д в процессе хранения в климатической камере. Значения представлены в виде площадей пиков* 10^{-7}

В группе α,β -ненасыщенных альдегидов можно отметить тенденцию к росту содержания этих веществ в процессе хранения.

3.8 Гигиеническая оценка летучих веществ подсолнечных масел, хранившихся в климатической камере

В Таблице 3.8.1 представлено сравнение площадей летучих веществ с установленным классом опасности и/или канцерогенности по МАИР в зависимости от степени очистки масел и времени их хранения в климатической камере. На конец срока хранения в масле 1P3Д содержалось 20 веществ с установленным классом опасности, в масле 1P2Д - 18, в масле 1P1Д - 9 таких веществ. Площади всех этих веществ, за исключением пентана, гексана и 1-бутанола, росли с увеличением срока хранения масел.

Таблица 3.8.1 - Динамика летучих веществ подсолнечных масел разной степени очистки, имеющих классы опасности, в зависимости от срока хранения в климатической камере.

Название соединения	СанПиН 1.2.3685-21	МАИР	Площади летучих веществ по ПИД* 10^{-7}					
			Масло 1P1Д		Масло 1P2Д		Масло 1P3Д	
			0 нед	6 нед	0 нед	8 нед	0 нед	8 нед
Пентан	4		<0,01	0,01	2,78	0,46	2,56	0,21
Гексан	4		1,11	0,95	0,43	0,27	0,68	0,22
Ацетальдегид	3	2В	0,01	<0,01	0,02	<0,01	<0,01	0,02
Пропаналь	3		-	-	-	-	<0,01	0,07
Бутанал	3		-	-	0,01	0,04	<0,01	0,05
Этиловый спирт	4		0,05	0,04	<0,01	0,08	<0,01	0,04
Пентаналь	4		0,03	0,04	0,14	0,41	0,11	0,65
Гексаналь	2		0,05	0,05	0,63	3,98	1,09	7,64

1-бутанол	3		-	-	0,01	<0,01	0,01	<0,01
1,2-Эпоксигептан	(1-3)*	(2В)*	-	-	<0,01	0,03	0,01	0,05
2-гептанон	-		-	-	0,03	0,10	0,05	0,19
Гептаналь	3		-	-	0,02	0,03	0,02	0,10
Лимонен	4	3	<0,01	0,08	0,01	0,03	0,01	0,06
1-пентанол	3		0,01	0,02	0,05	0,18	0,03	0,26
2-октанон	4		-	-	0,01	0,02	0,02	0,04
Октаналь	2		-	-	-	-	0,01	0,05
1-гексанол	3		-	-	<0,01	<0,01	<0,01	0,07
Нонаналь	2		-	-	0,01	0,01	0,01	0,06
2,4-гептадиеналь	-	(2В)**	-	-	<0,01	0,05	<0,01	0,11
Гексановая кислота	3		0,02	0,08	0,05	0,34	0,15	1,38

* в зависимости от изомера, к группе 2В возможных канцерогенов человека отнесен изомер 1,2-эпоксибутан.

** к 2В отнесен изомер 2,4-гексадиеналь

3.9 Изменение состава подсолнечных масел разной степени очистки в процессе длительного хранения при -25°C

В процессе выполнения настоящей работы было протестировано наличие различных изменений, которые могли иметь место в исследуемых подсолнечных маслах в процессе их хранения в морозильной камере при -25°C с 2017 по 2021 годы. Эти изменения были зарегистрированы путём снятия ИК-спектров, определения перекисного числа и анализа летучих веществ подсолнечных масел до помещения масел в морозильную камеру и после хранения в ней.

3.9.1 Изменение ИК-спектров подсолнечных масел при хранении в морозильной камере

Методом ИК-спектроскопии были проанализированы масла 1Д6Н, 2Д8Н и 3Д8Н производства 2018 года. Спектры одних и тех же образцов были сняты в 2018 и 2020 годах, результаты их наложения в регионе 3100 см^{-1} - 2700 см^{-1} представлены на 3.9.1.1.

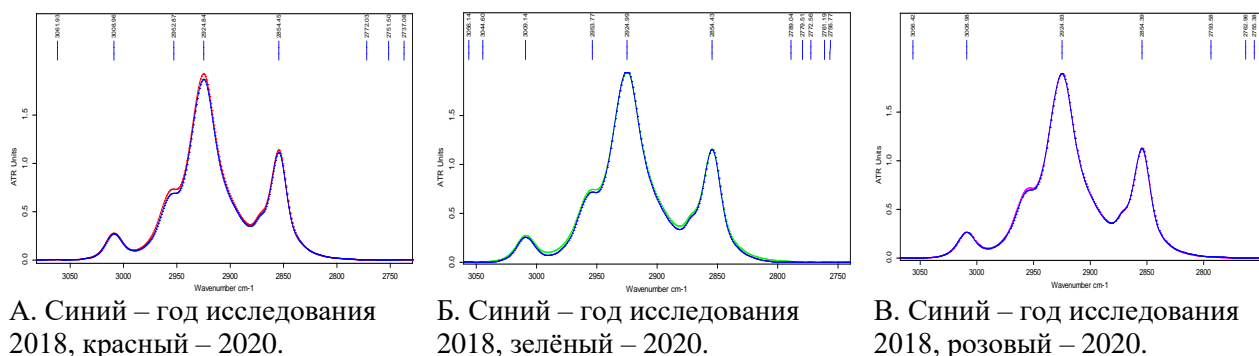
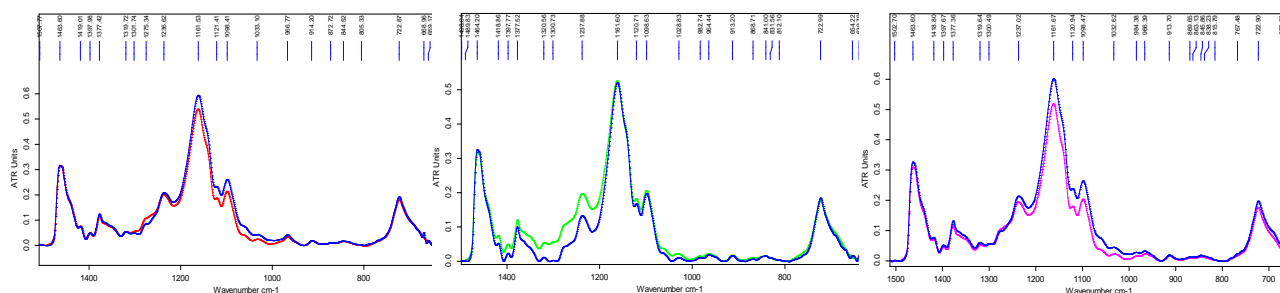


Рис. 3.9.1.1 Изменения в ИК-спектрах подсолнечных масел 2018 года производства, произошедшие на 3 года хранения в морозильной камере, регион 3100 см^{-1} - 2700 см^{-1} . А. Масло 1Д6Н, Б. Масло 2Д8Н, В. Масло 3Д8Н. Рисунки в увеличенном размере представлены в Приложении Г.

Согласно этим рисункам для всех образцов характерно увеличение интенсивности полос метильных $\nu(-\text{CH}_3)$ (2953 см^{-1} , 2872 см^{-1}) групп образцов от 2020 года по сравнению с образцами от 2018 года. Интенсивность полос симметричных/ассимметричных валентных колебаний метиленовых $\nu(-\text{CH}_2-)$ (2925 см^{-1} , 2854 см^{-1}) групп увеличивалась за этот же период только в образце 1Д6Н, а полосы валентного колебания *цис*-олефиновой двойной связи $\nu(-\text{CH}=\text{CH}-)$ при 3009 см^{-1} только в образце 2Д8Н. В образце 3Д8Н от 2018 и 2020 гг поглощение в регионе $3100\text{-}2700 \text{ см}^{-1}$ совпадало практически по всем волновым числам.

Регион $1500 \text{ см}^{-1}\text{-}600 \text{ см}^{-1}$ во всех исследуемых образцах имел свои особенности (рис. 3.8.1.2). Так, в образцах 1Д6Н от 2018 и 2020 гг он совпадал везде кроме части $1319 \text{ см}^{-1}\text{-}996 \text{ см}^{-1}$: на этом участке происходило снижение интенсивности везде, кроме полосы при 1275 см^{-1} (3.9.1.2А). Рисунок 3.9.1.2В аналогичен рисунку 3.9.1.2А за исключением полосы при 1275 см^{-1} , которая в образце 3Д8Н имела менее выраженную разницу в интенсивности между образцами от 2018 и 2020 гг.



А. Синий – год исследования 2018, красный – 2020.

Б. Синий – год исследования 2018, зелёный – 2020.

В. Синий – год исследования 2018, розовый – 2020.

Рис. 3.9.1.2 Изменения в ИК-спектрах подсолнечных масел 2018 года производства, произошедшие на 3 года хранения в морозильной камере, регион $1500 \text{ см}^{-1}\text{-}600 \text{ см}^{-1}$. А. Масло 1Д6Н, Б. Масло 2Д8Н, В. Масло 3Д8Н. Рисунки в увеличенном размере представлены в Приложении Г.

В образцах 2Д8Н от 2018 и 2020 гг регион $1500 \text{ см}^{-1}\text{-}600 \text{ см}^{-1}$ не совпадал в части $1418 \text{ см}^{-1}\text{-}1161 \text{ см}^{-1}$ и $1120 \text{ см}^{-1}\text{-}964 \text{ см}^{-1}$. Здесь, в отличие от образцов 1Д6Н интенсивность образца 2Д8Н от 2020 года была выше интенсивности соответствующих волновых чисел образца 2Д8Н от 2018 года.

В целом, однако, статистически значимого изменения (при $p=0,05$) интенсивности поглощения или значений волновых чисел ни в одном масле обнаружено не было.

3.9.2 Изменение перекисного числа подсолнечных масел при хранении в морозильной камере

Согласно полученным данным, перекисное число подсолнечных масел после двухлетнего хранения в морозильной камере при -25°C в целом слабо увеличилось относительно этого же показателя до помещения масел в камеру, в среднем на 5%-30% (медиана 13%). Это показано на рисунке 3.9.2.1.

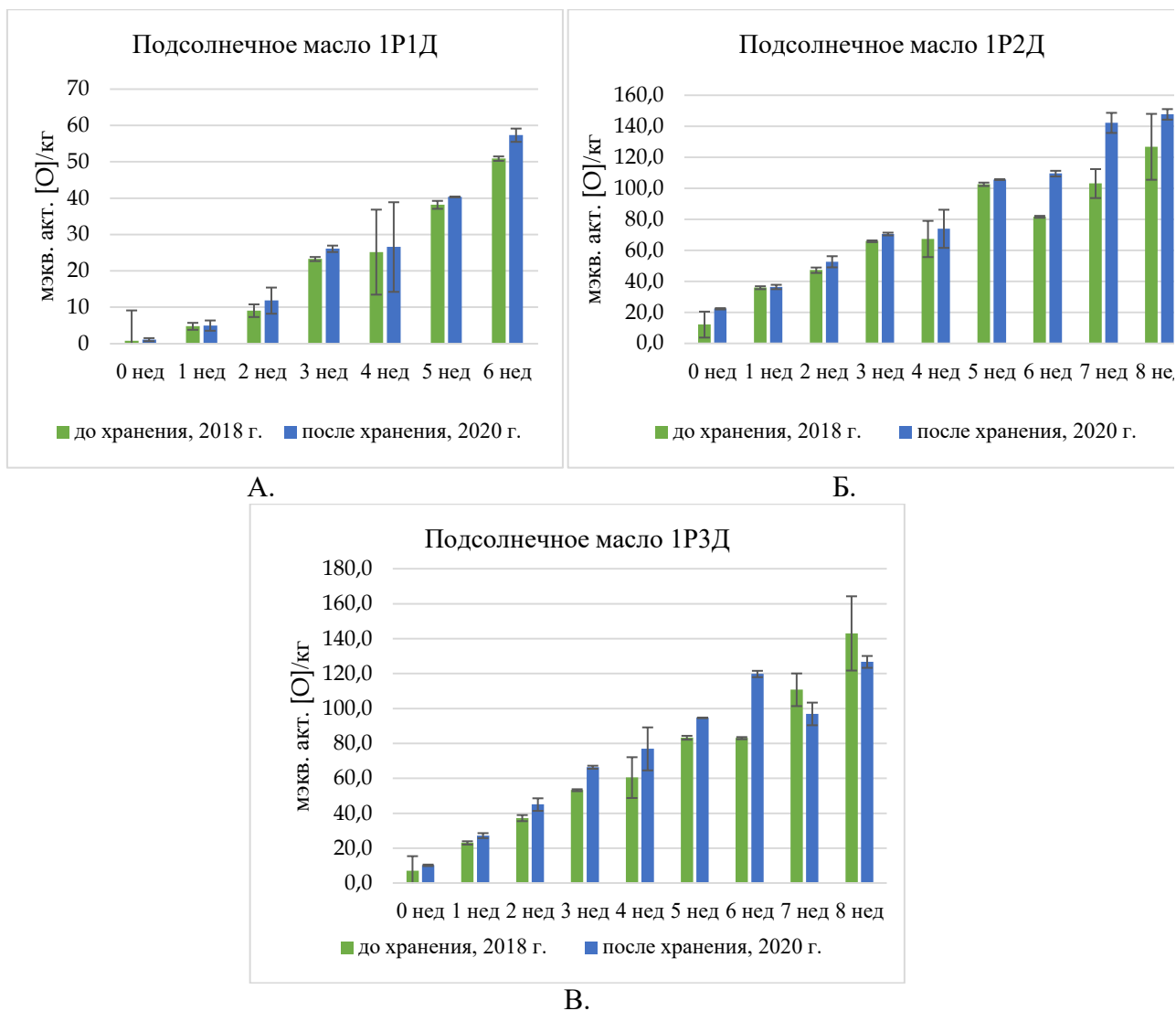


Рис. 3.9.2.1 Сравнение перекисного числа подсолнечных масел разной степени очистки и длительности хранения в климатической камере при 35 °С, постоянного освещения и аэрации до (2018 год) и после (2020 год) хранения при -25° С. А. – масло 1P1Д; Б. – масло 1P2Д; В. – масло 1P3Д. Значения ПЧ в 2018 г. представлены в виде среднего из трёх параллельных измерений ± стандартное отклонение; значения ПЧ в 2020 г. — среднее из двух параллельных измерений ± стандартное отклонение.

Тем не менее, статистически значимое увеличение прослеживается только в маслах 1P1Д и 1P2Д ($p < 0,05$).

3.9.3 Изменение профиля летучих веществ подсолнечных масел при хранении в морозильной камере

В целях изучения стабильности летучих веществ и летучих продуктов окисления подсолнечного масла в морозильной камере было проведено исследование методом ТФМЭ-ГХ/МС-ПИД профилей масел разной степени очистки, а именно прессового, 1P1Д, 1P2Д, 1P3Д и 1P4Д 2019 года производства. Летучие вещества этих масел анализировали в октябре 2020 года и в марте 2021 года (через 5 месяцев хранения). До проведения анализа, а также в течение 5-ти месячного периода масла находились в морозильной

камере при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в максимально возможно заполненных флаконах из тёмного стекла на 22 мл под крышками с септами. Для сравнения полученных данных проводили суммирование абсолютных площадей соответствующих групп соединений, результаты представлены на рис. 3.9.3.1.

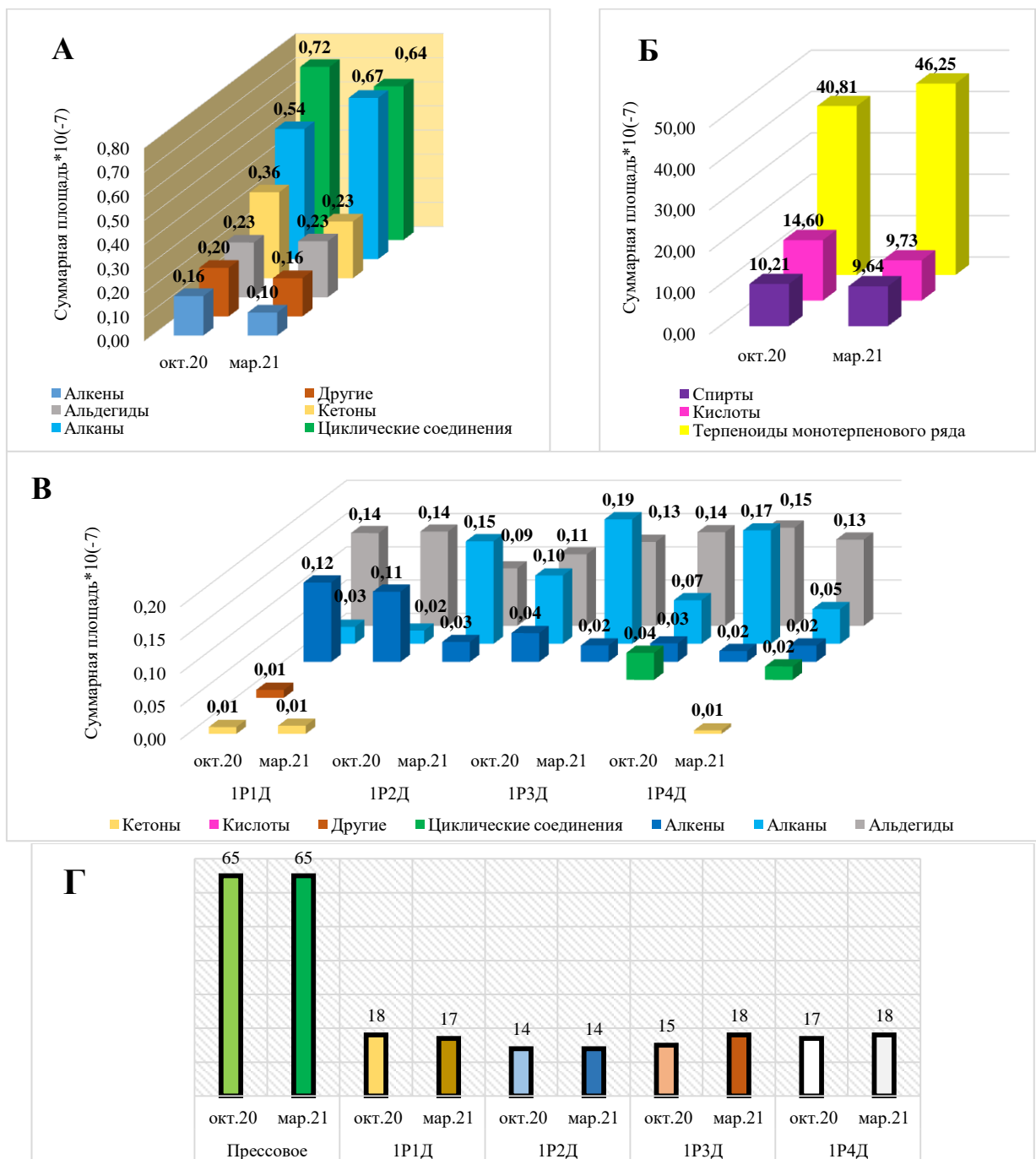


Рис. 3.9.3.1 Сравнение площадей летучих веществ неокисленного подсолнечного масла различной степени очистки до и после 5-ти месячного хранения в морозильной камере при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Алканы представлены без учёта гексана, спирты – без учёта этанола. Одинаковые цвета на всех графиках соответствуют одним и тем же соединениям. А, Б – летучие вещества прессового масла, В - летучие вещества масел 1P1Д, 1P2Д, 1P3Д, 1P4Д, Г – общее количество найденных соединений всех образцов.

Согласно рисунку 3.9.3.1 абсолютные значения сумм площадей каждой группы соединений всех исследованных образцов подсолнечного масла оставались в пределах одного порядка в течение 5 месяцев хранения в морозильной камере (рис. 3.9.3.1 А-В);

количество зарегистрированных соединений также оставалось практически неизменным (рис. 3.9.3.1 Г). Относительное содержание отдельных групп летучих соединений в прессовом масле в целом было близким до и после хранения, за исключением группы кислот и терпеноидов, доли которых изменились с 21,5% до 14,4% и с 60,2% до 68,4% соответственно. В группе очищенных масел присутствовало больше всего алканов, алкенов и альдегидов и их соотношения отличались до и после хранения. Так, доли альдегидов в маслах 1Р1Д, 1Р2Д, 1Р3Д и 1Р4Д за 5 месяцев хранения в морозильной камере выросли с 44,6% до 49,5%, с 31,9% до 42,4%, с 37,3% до 50,5% и с 44,1% до 55,9% соответственно. Также изменялось относительное содержание алкенов: в масле 1Р1Д оно оставалось практически неизменным, а в маслах 1Р2Д, 1Р3Д и 1Р4Д оно росло с 11,1% до 17,1%, с 7,3% до 10,0% и с 4,9% до 10,6% соответственно. Относительное содержание алканов при этом падало с увеличением степени очистки масла (гексан в расчёт не принимали): с 8,2% до 7,0% после 5 месяцев хранения, с 57,0% до 40,6%, с 55,4% до 23,5% и с 51,0% до 22,5% соответственно. Несмотря на выделенные тенденции, количество исследованных образцов, а также отсутствие стандартизации при проведении ТФМЭ-анализа (например, использования метода внутреннего стандарта) не позволяют сделать однозначного вывода о влиянии 5-ти месячного хранения в морозильной камере при -25 °С на профиль летучих веществ подсолнечных масел разной степени очистки.

Более значимые изменения были зарегистрированы при анализе образца масла 1Р1Д производства 2018 года, который подвергался форсированному окислению в климатической камере по п.2.1.2. в целях подбора оптимальных условий для ТФМЭ. Хроматограммы этого образца сразу после завершения окисления (2018 год исследования) и по истечении 3 лет хранения в морозильной камере при -25 °С (2021 год исследования) приведены на рис. 3.9.3.2. Важно отметить, что весь период хранения образец масла находился во флаконе на 22 мл из тёмного стекла под крышкой с септой; количество образца во флаконе было около 10 мл.

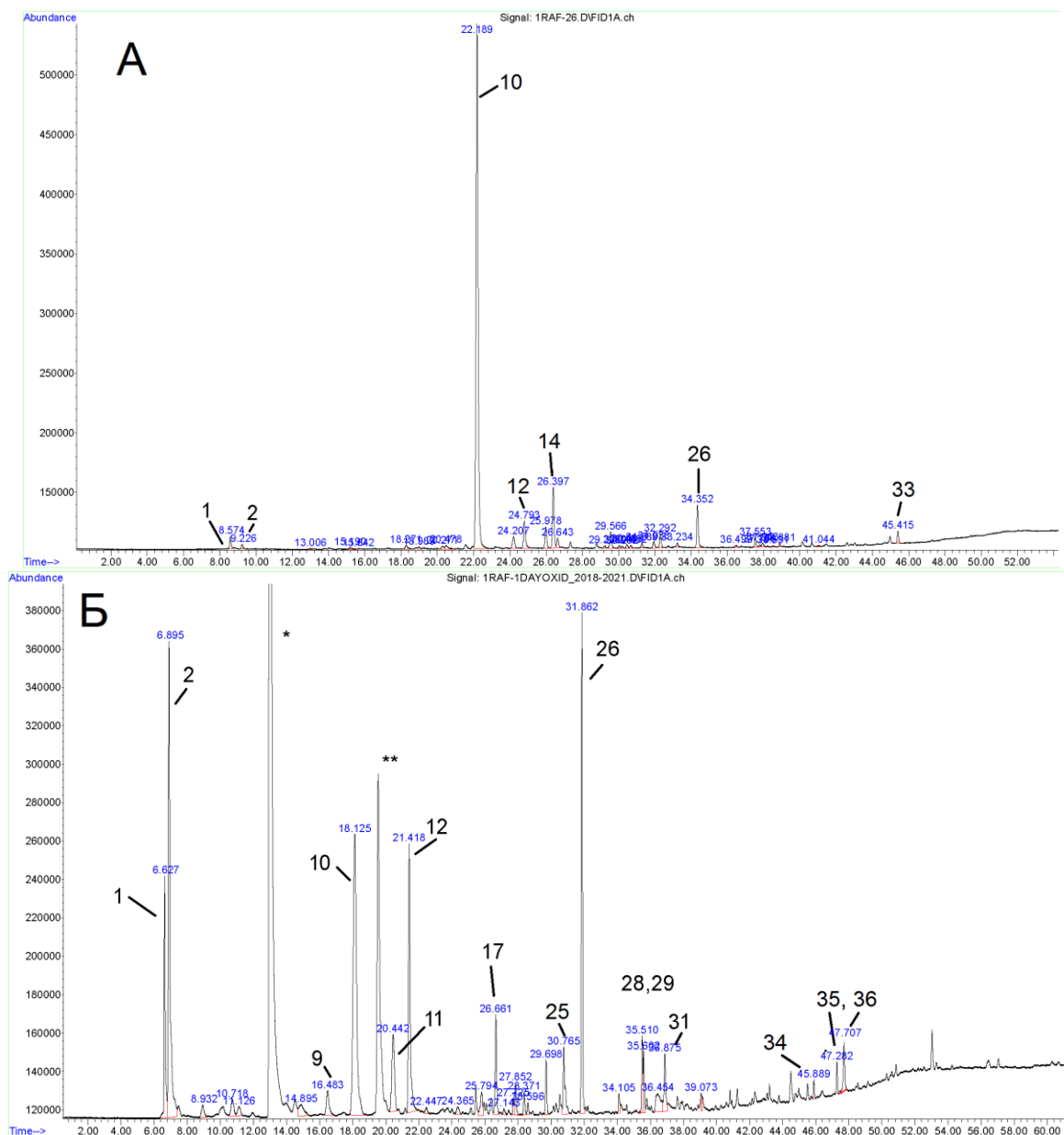


Рис. 3.9.3.2 А – ГХ/ПИД-хроматограмма летучих веществ подсолнечного масла 1Р1Д от 2018 года, проанализированного в 2018 году. Б – ГХ/ПИД-хроматограмма летучих веществ подсолнечного масла 1Р1Д от 2018 года, проанализированного в 2021 году, после хранения в морозильной камере при -25°C . На хроматограммах идентифицированными являются вещества, имеющие времена удерживания. Помеченные звёздочками пики не относятся к образцу. Расшифровка помеченных цифрами пиков приведена в таблице 3.9.3.1.

Несмотря на то, что исследованное масло прошло однократную рафинацию и дезодорацию, а также намеренно окислялось в климатической камере, основными компонентами на хроматограмме от 2018 года (рис. 3.9.3.2А) являлись терпены: α -пинен, сабинен, α -терпинен, а также неидентифицированные терпены. Вторичные продукты окисления, такие как альдегиды, кетоны и спирты были представлены в значительно меньших количествах. Длительное хранение в морозильной камере с доступом воздуха изменило профиль летучих соединений исследованного образца. Так, площади всех идентифицированных вторичных продуктов на хроматограмме от 2021 года (рис. 3.9.3.2Б)

были примерно в 4-12 раз больше, а площади части летучих веществ, таких как бензол, камфен, α -терпинен, d1-лимонен, β -фелландрен, γ -терпинен, ρ -цимол – больше в 1-9 раз (см. таблицу 3.9.3.1). Исключение составили α -пинен и β -пинен, площади которых уменьшились в 0,6 и 0,2 раза соответственно, а также сабинен, стирол и некоторые неидентифицированные производные, пики которых не были обнаружены на хроматограмме образца после хранения в морозильной камере. Важно также отметить появление на хроматограмме от 2021 г. новых вторичных продуктов окисления - (E,Z)-2,4-декадиенала и (E,E)-2,4-декадиенала, а также гексановой кислоты.

Таблица 3.9.3.1. Сравнение площадей летучих веществ подсолнечного масла 1P1Д производства 2018 года до и после хранения в морозильной камере при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Данные представлены в виде $ab \cdot 10^{-7}$.

№	Времена удерживания, мин		Название соединения	Год исследования	
	(2018)	(2021)		2018	2021
1	8,574	6,626	Пентан	0,061	0,64
2	9,225	6,892	Гексан	0,025	1,81
3	13,006	8,934	Октан	0,008	0,07
4	15,19	10,720	1-Октен	0,015	0,10
5	15,644	11,127	2-Октен	0,006	0,06
6	18,269		Этанол	0,030	-
7	18,988	14,895	Бензол	0,014	0,13
8	20,273		2,3-бутандион	0,020	-
9	20,478	16,483	Пентаналь	0,027	0,15
10	22,191	18,123	α -пинен	3,589	2,13
11	24,212	20,444	Камфен	0,084	0,49
12	24,794	21,42	Гексаналь	0,175	1,10
13	25,976	22,448	β -пинен	0,129	0,03
14	26,396		Сабинен	0,330	-
15	26,636		Производное терпена	0,063	-
16	29,231		α -терпинен	0,013	-
17	29,565	26,662	d1-лимонен	0,092	0,36
18	30,044	27,141	β -фелландрен	0,014	0,02
19	30,203	27,723	(E)-2-гексеналь	0,009	0,05
20	30,464	27,852	2-пентилфуран	0,020	0,10
21	30,682	28,37	1-пентанол	0,017	0,07
22	31,286		γ -терпинен	0,028	-
23	31,937		Стирол	0,038	-
24	32,292	29,697	ρ -цимол	0,076	0,16
25	33,23	30,764	1-Октен-3-он	0,022	0,18
26	34,352	31,864	(E)-2-гептеналь	0,225	1,29
27	36,497	34,104	Нонаналь	0,016	0,06
28	37,555	35,508	1-октен-3-ол	0,041	0,18
29	37,786	35,602	(E)-2-октеналь	0,012	0,15
30	38,531	36,45	Уксусная кислота	0,009	0,20
31	38,882	36,874	2-этилгексанол	0,013	0,20

32	41,04	39,075	1-октанол	0,007	0,06
33	45,416		Производное терпена	0,058	-
34		45,888	(E,Z)-2,4-декадиеналь	-	0,04
35		47,283	(E,E)-2,4-декадиеналь	-	0,08
36		47,707	Гексановая кислота	-	0,18

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Установлено, что наибольший вклад в изменение *жирнокислотного состава* подсолнечного масла вносила степень очистки. Первичная дезодорация способствовала увеличению содержания транс-изомеров линолевой кислоты с 1 мг/г масла до 12 мг/г масла. Дальнейшие дезодорации ещё больше увеличивали содержание транс-изомеров С18:2.

2. Абсолютное содержание перекисных соединений в масле 1Р1Д на начало срока хранения в климатической камере было ниже, чем в маслах 1Р2Д и 1Р3Д, однако скорость прироста *перекисного числа* в процессе нефорсированного окисления была выше в масле 1Р1Д и составила после 1 недели хранения 631% прироста (296% и 331% в маслах 1Р2Д и 1Р3Д соответственно). Повторные дезодорации практически не изменяли абсолютные значения перекисного числа в маслах 1Р1Д-1Р4Д.

3. Показано, что в исследованных маслах величина *анизидинового числа* зависела от степени очистки и не зависела от длительности хранения в условиях нефорсированного окисления.

4. Наиболее значимые изменения на ИК-спектрах неокисленных подсолнечных масел разной степени очистки были отражены в изменении величины и интенсивности полосы поглощения, характерной для деформационного колебания изолированных *транс*, *транс*-двойных связей ($-C=CH-$): с 963 см^{-1} до 965 см^{-1} и с 0,017 ATR Units до 0,021 ATR Units соответственно.

На ИК-спектрах подсолнечных масел 1Р1Д, 1Р2Д и 1Р3Д, подвергавшихся нефорсированному окислению в течение 6-8 недель, были зарегистрированы изменения интенсивности полос, характерных для деформационных колебаний конъюгированных *транс*, *транс*- и *цис*, *транс*- двойных ($-C=CH-$) связей. В масле 1Р1Д интенсивность полосы при 986 см^{-1} увеличилась с 0,011 ATR Units (1Д4Н) до 0,015 ATR Units (1Д6Н), в масле 1Р2Д величина длины волны стала 984 см^{-1} , а её интенсивность росла с 0,008 ATR Units до 0,015 ATR Units. В масле 1Р3Д интенсивность при 984 см^{-1} росла с 0,009 ATR Units до 0,016 ATR Units.

5. Было установлено, что наиболее подходящим волокном для анализа ароматического профиля подсолнечных масел методом ТФМЭ-ГХ-МС/ПВД является волокно 50/30 мкм дивинилбензол/карбоксен/полидиметилсилоксан (Д/К/П).

6. Методом построения профиля желательности было установлено, что оптимальными условиями экстракции всего спектра летучих соединений с одновременным предотвращением возможного новообразования вторичных продуктов окисления являются $T_{\text{эксп}}, 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{эксп}}, 20\text{ мин}$, $T_{\text{дес}}, 255\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{дес}}, 3\text{ мин}$.

7. Установлено, что одним из значимых отличительных признаков свежего неочищенного масла от рафинированных и дезодорированных является наличие спиртов, кислот, и монотерпеноидов. Мажорными соединениями очищенных масел являлись альдегиды, причём их доля в общем спектре идентифицированных соединений росла с увеличением глубины очистки масла. Кроме того, в маслах 1P2Д и 1P3Д были обнаружены новые, по сравнению с маслом 1P1Д соединения, такие кетоны как 2-гептанон, 2-октанон, 1-октен-3-он, (E)-3-октен-2-он, (E,E)-3,5-октадиен-2-он, а также несколько α,β -ненасыщенных альдегидов – (E,E)-2,4-гептадиеналь, 2,4-октадиеналь, (E,Z)-2,4-декадиеналь, (E,E)-2,4-декадиеналь.

8. Установлено, что количество насыщенных, мононенасыщенных и α,β -ненасыщенных альдегидов в маслах 1P2Д и 1P3Д в процессе хранения в климатической камере росло значительно быстрее, чем в масле 1P1Д.

9. В маслах 1P2Д и 1P3Д был обнаружен 1,2-эпоксигептан, гомолог которого 1,2-эпоксибутан отнесён к группе 2В «возможных канцерогенов человека» МАИР.

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭФИРОВ 3-МХПД, 2-МХПД, ЭФИРОВ ГЛИЦИДОЛА В ПИЩЕВЫХ МАСЛАХ И ЖИРАХ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И СПОСОБА ОБРАБОТКИ

4.1 Оптимизация и метрологическая оценка методики определения эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и эфиров глицидола методом длительной щелочной переэтерификации с ГХ/МС-МС⁸

Определение эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола проводили методом, разработанным на основе стандарта ISO 18363-2:2018⁹. Последний подразумевает отщепление жирных кислот от 3- МХПДЭ, 2-МХПДЭ и ГЭ путём длительной щелочной переэтерификации при температуре -25 °С, экстрагирование свободных форм 3- МХПД, 2-МХПД и глицидола, дериватизацию аналитов фенилборной кислотой и разделение методом ГХ-МС. В процессе работы были внесены следующие изменения относительно исходной стандартной процедуры (таблица 4.1.1):

Таблица 4.1.1 – Сравнение стандартного и нового вариантов подготовки проб и проведения измерений. [16].

ISO 18363-2:2018	Предложенный вариант	Результат
Растворы стандартов 1,3-дипальмитат-2-МХПД-D5 и стандарта 1,2-дипальмитат-3-МХПД-D5 готовятся отдельно	Готовят совместный раствор стандартов 1,3-дипальмитат-2-МХПД-D5 и 1,2-дипальмитат-3-МХПД-D5	Уменьшение времени подготовки проб
3 раза по 600 мкл	2 раза по 900 мкл	Уменьшение времени подготовки проб
Моноквадруполь, SIM-режим регистрации ионов	Тройной квадруполь, MRM-режим регистрации ионов	Повышение селективности
Без использования градуировки	С построением градуировочных прямых	Корректировка показаний детектора

Основными отличиями нового варианта методики от стандартного были:

1. Использование тройного квадрупольного детектора и ионных переходов для повышения селективности и чувствительности метода
2. Построение градуировочных прямых для корректного расчёта результатов
3. Корректировка формул расчёта количества 3-МХПДЭ, 2-МХПДЭ и эфиров глицидола в пищевых маслах и жирах
4. Контроль точности результатов путём исследования контрольной пробы с известной концентрацией аналитов в каждой последовательности проб.

⁸ Работа, описание которой представлено в разделе 4.1 Главы 4 была выполнена под руководством и при непосредственном участии старшего научного сотрудника лаборатории химии пищевых продуктов ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», к.ф.н. Малинкина Алексея Дмитриевича.

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. 2018. – 21 p.

5. Проведение метрологической аттестации методики

4.1.1 Подбор параметров MRM-режима работы детектора

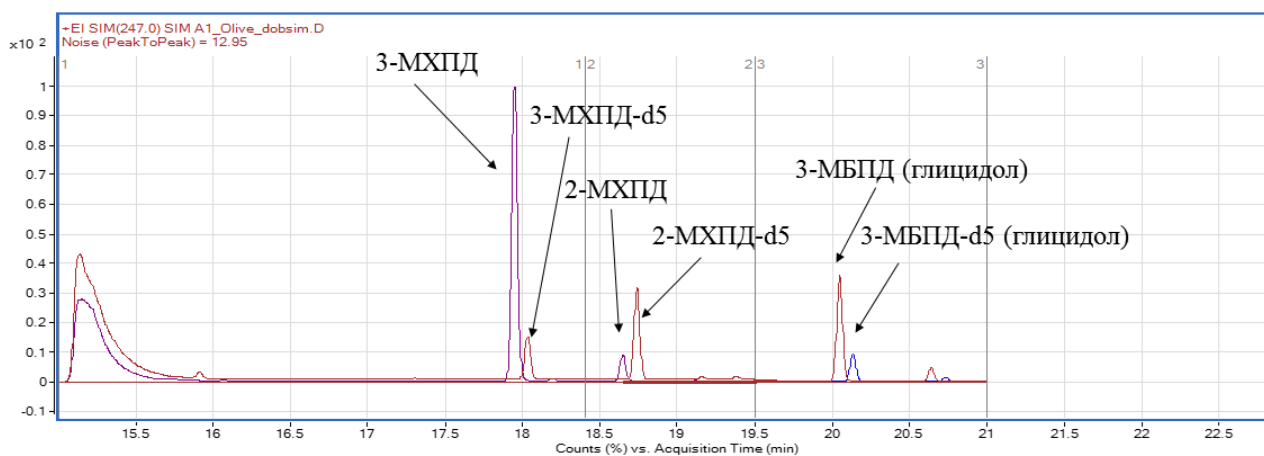
Экспериментальным путём были подобраны пары родительских и дочерних ионов и соответствующие энергии соударения для 3-МХПД, 2-МХПД, глицидола и их дейтерированных аналогов (табл. 4.1.1.1).

Таблица 4.1.1.1 – Оптимальные параметры режима мониторинга выбранных реакций для тройного квадруполя Agilent Technologies 7000С [16].

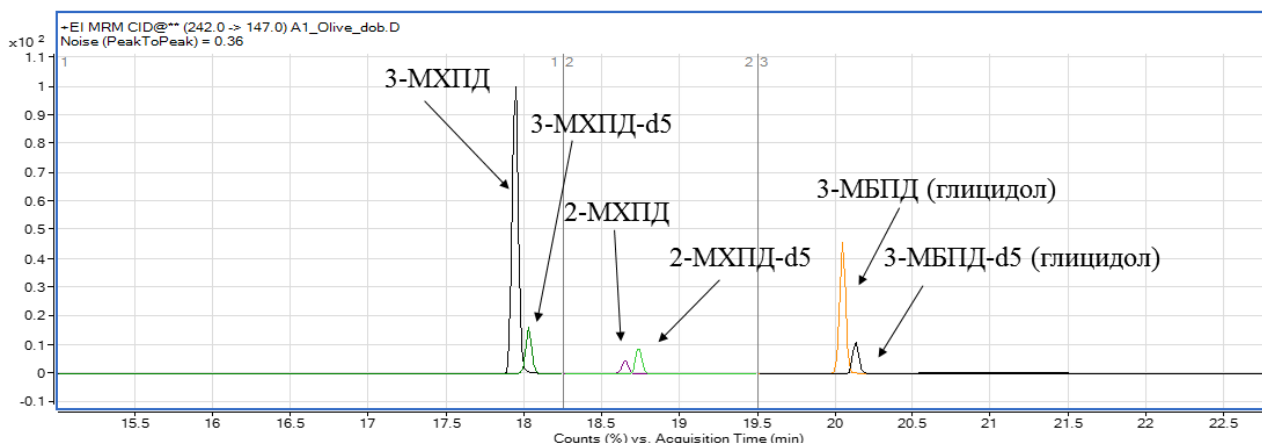
Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-фрагмент, m/z	Энергия соударения, eV	Временной сегмент
3-МХПД*	196	147	10	15,0-18,4 мин.
3-МХПД	196	91	25	
3-МХПД-d5*	201	150	10	
3-МХПД-d5	201	93	25	
2-МХПД*	196	104	25	18,4-19,5 мин.
2-МХПД	196	91	15	
2-МХПД-d5*	201	107	10	
2-МХПД-d5	201	104	20	
3-МБПД*	242	147	10	19,5-23,0 мин.
3-МБПД	242	91	25	
3-МБПД-d5*	247	150	10	
3-МБПД-d5	247	93	25	

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

Сравнение хроматограмм в SIM- и MRM-режимах работы тройного квадруполя детектора ожидаемо показало большую селективность при работе в режиме мониторинга выбранных реакций: на хроматограмме А присутствовали исследуемые аналиты и сторонние пики, на хроматограмме Б – только аналиты (рис. 4.1.1.1А и Б)



А. SIM-режим работы тройного квадруполя, проба А.



Б. MRM-режим работы тройного квадруполя, проба А.

Рис. 4.1.1.1 Сравнение хроматограмм, полученных в SIM- и MRM-режимах работы тройного квадруполя. Образец: оливковое масло с добавкой, концентрация 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола по 1 мг/кг, соответствующих стандартов по 0,5 мг/кг

Использование режима мониторинга переходов масс (MRM) вместо режима мониторинга выбранного иона (SIM) позволило также увеличить соотношение сигнал/шум при детектировании 3-МХПД на 4 порядка, 3-МХПД-d5 и 2-МХПД на 3 порядка, 3-МБПД и 3-МБПД-d5 на порядок. Соотношение сигнал/шум при детектировании 2-МХПД-d5 изменилось незначительно (табл. 4.1.1.2).

Таблица 4.1.1.2 – Соотношение сигнал/шум в разных режимах работы тройного квадруполя при исследовании образца оливкового масла с добавкой 1 мг/кг (все аналиты) и 0,5 мг/кг (все стандарты).

Аналит	Проба для расчёта	SIM-режим, ед.	MRM-режим, ед.
3-МХПД	Б	7,5 (m/z 196)	26501,4 (196->147)
3-МХПД-d5	Б	415,4 (m/z 201)	28696,6 (201->150)
2-МХПД	Б	18,6 (m/z 196)	3956,0 (196->104)
2-МХПД-d5	Б	941,7 (m/z 201)	1099,4 (201->107)
3-МБПД	А	63,5 (m/z 242)	778,4 (242->147)
3-МБПД-d5	А	309,9 (m/z 247)	1176,5 (247->150)

Дальнейшие исследования позволили установить более подходящие пары ионов, которые приведены в таблице 4.1.1.3 и были использованы для анализа нативных образцов.

Таблица 4.1.1.3 – Параметры режима мониторинга выбранных реакций тройного квадруполя Agilent Technologies 7000С, которые применялись для анализа нативных образцов. Жирным выделены изменённые параметры.

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-фрагмент, m/z	Энергия соударения, eV	Временной сегмент
3-МХПД*	196	147	10	15,0-18,4 мин.
3-МХПД	198	147	5	
3-МХПД-d5*	201	150	10	
3-МХПД-d5	203	150	5	

2-МХПД*	196	104	25	18,4-19,5 мин.
2-МХПД	198	104	15	
2-МХПД-d5*	201	107	10	
2-МХПД-d5	203	107	10	
3-МБПД*	240	147	5	19,5-23,0 мин.
3-МБПД	242	147	10	
3-МБПД-d5*	245	150	5	
3-МБПД-d5	247	150	10	

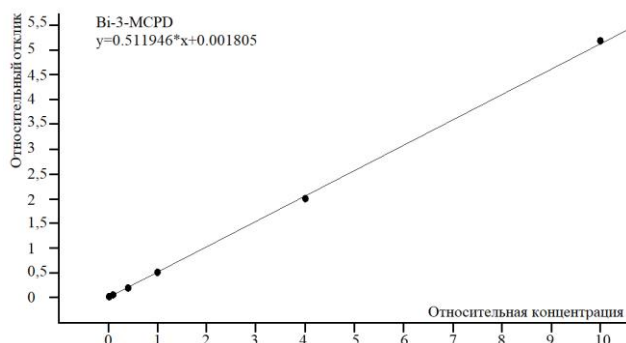
*Примечание. Отмеченные пары ионов использовались для количественного расчёта, остальные – в качестве подтверждающих

4.1.2 Построение градуировочных прямых

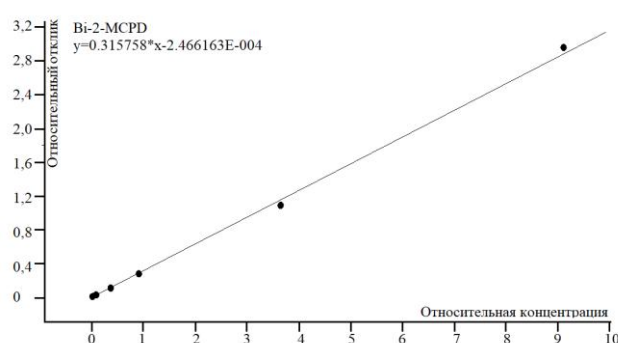
Градуировочные прямые строили по 6 точкам. Для этого готовили следующие совместные разведения:

- 3-МХПД и глицидола с концентрациями каждого 0,01; 0,05; 0,2; 0,5; 2; 5 мг/кг в метаноле.
- 1,2-дипальмитоил-3-МХПД (3-МХПДЭ) и 1,3-дипальмитоил-2-МХПД (2-МХПДЭ) с концентрациями, эквивалентными содержанию свободных 3-МХПД и 2-МХПД 0,01; 0,05; 0,2; 0,5; 2; 5 мг/кг каждого в толуоле.

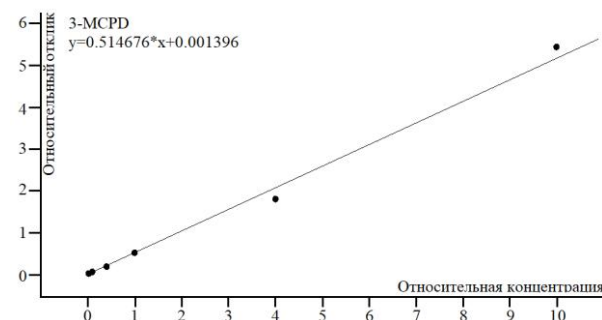
Полученные градуировочные графики и соответствующие коэффициенты аппроксимации представлены на рисунке 4.1.2.1 [16].



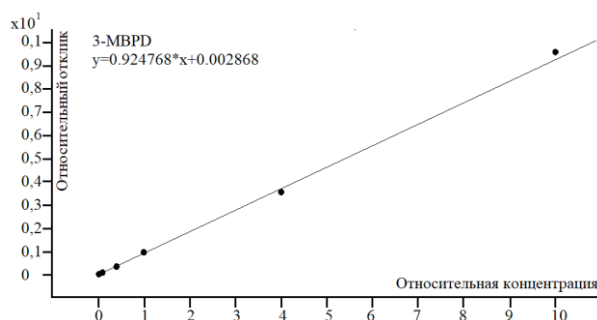
А. 1,2-дипальмитоил-3-МХПД.
Весовая функция $1/x$, $R^2=0,999$



Б. 1,3-дипальмитоил-2-МХПД.
Весовая функция $1/x$, $R^2=0,998$



В. 3-МХПД.
Весовая функция $1/x$, $R^2=0,994$



Г. 3-МБПД (глицидол)
Весовая функция $1/x^2$, $R^2=0,989$

Рис. 4.1.2.1 Градуировочные графики 3-МХПДЭ, 2-МХПДЭ, 3-МХПД и 3-МБПД (глицидола).

Градуировочные прямые считали удовлетворительными при величине коэффициента аппроксимации не менее 0,98.

4.1.3 Расчёт содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидиловых эфиров

Содержание 3-МХПДЭ, 2-МХПДЭ и эфиров глицидола в маслах определяли в пересчёте на соответствующую свободную форму на основе построенных градуировочных прямых по формулам¹⁰:

$$C_{3\text{-МХПД(а)}} = \frac{G_1 \times 0,6}{m}; \quad (2)$$

$$C_{\text{глицидола (а)}} = \frac{G_2 \times 0,6}{m}; \quad (3)$$

$$C_{3\text{-МХПД(б)}} = \frac{G_3 \times 0,6}{m}; \quad (4)$$

$$C_{2\text{-МХПД(б)}} = \frac{G_4 \times 0,6}{m}; \quad (5)$$

$$C_{\text{глицидола (б)}} = \frac{C_{3\text{-МХПД(б)}}}{C_{3\text{-МХПД(а)}}} \times C_{\text{глицидола (а)}}; \quad (6)$$

Здесь:

$C_{3\text{-МХПД (а)}}$ – содержание 3-МХПД в пробе А, мкг/г;

$C_{\text{глицидола (а)}}$ – содержание глицидола в пробе А, мкг/г;

$C_{3\text{-МХПД (б)}}$ – содержание 3-МХПД в пробе Б, мкг/г;

$C_{2\text{-МХПД (б)}}$ – содержание 2-МХПД в пробе Б, мкг/г;

$C_{\text{глицидола (б)}}$ – содержание глицидола в пробе Б, мкг/г;

G_1 – масса 3-МХПД во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе А, рассчитанная по градуировке, мкг;

G_2 – масса глицидола во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе А, рассчитанная по градуировке, мкг;

G_3 – масса 3-МХПД во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе Б, рассчитанная по градуировке, мкг;

G_4 – масса 2-МХПД во вводимой в хромато-масс-спектрометр пробе Б, рассчитанная по градуировке, мкг;

m – масса навески образца, г.

¹⁰ МУК 4.1.3547-19 Определение содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и животных жирах. 2019. – 17 с.

0,6 – коэффициент корректировки разницы между объёмом растворов для калибровки (600 мкл) и массой навески образца (около 100 мг)

За окончательный результат по каждому аналиту принимали значение, полученное для пробы Б с точностью до второго десятичного знака.

4.1.4 Анализ контрольной пробы

В каждой последовательности образцов проводили хотя бы одно измерение контрольной пробы, которая представляла собой нерафинированное оливковое масло прямого отжима с внесением 1,2-дипальмитоил-3-МХПД, 1,3-дипальмитоил-2-МХПД и глицидил пальмитата в количестве, эквивалентном концентрации свободных 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола около 1 мг/кг масла каждого.

Исследование таких проб на протяжении семи месяцев показало необходимость в постоянном контроле надлежащей подготовки проб и работы масс-селективного детектора, поскольку получаемые значения для каждого из исследуемых соединений иногда значительно отличались от теоретических, особенно в случае глицидола (см. табл. 4.1.4.1) [16]:

Таблица 4.1.4.1 - Колебания содержаний 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в контрольных пробах. Пробы: нерафинированное оливковое масло с концентрацией свободных форм 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола около 1 мг/кг каждого*. Результаты представлены в виде среднего значения \pm ошибка метода.

Дата изготовления стандарта	Дата проведения измерения	3-МХПД, мг/кг		2-МХПД, мг/кг		Глицидол, мг/кг	
		Внесено	Найдено	Внесено	Найдено	Внесено	Найдено
22.07.2019	19.08.2019	0,98	0,99 \pm 0,49	0,98	0,76 \pm 0,26	0,98	0,91 \pm 0,63
	22.08.2019	0,98	0,96 \pm 0,48	0,98	0,60 \pm 0,21	0,98	1,05 \pm 0,72
	04.09.2019	0,98	0,93 \pm 0,46	0,98	0,59 \pm 0,41	0,98	0,80 \pm 0,28
26.09.2019	26.09.2019	0,98	0,90 \pm 0,45	0,98	0,90 \pm 0,32	0,98	0,84 \pm 0,58
03.12.2019	05.12.2019	1,00	0,84 \pm 0,42	1,00	0,81 \pm 0,28	1,00	0,78 \pm 0,54
	12.12.2019	1,00	0,97 \pm 0,48	1,00	0,87 \pm 0,30	1,00	1,25 \pm 0,86
	23.12.2019	1,00	0,91 \pm 0,46	1,00	0,81 \pm 0,28	1,00	0,58 \pm 0,40
17.02.2020	17.02.2020	1,00	0,98 \pm 0,49	1,00	1,02 \pm 0,36	1,00	0,71 \pm 0,49
03.03.2020	03.03.2020	1,00	0,91 \pm 0,46	1,00	0,89 \pm 0,31	1,00	0,74 \pm 0,51
05.03.2020	05.03.2020	0,96	0,99 \pm 0,46	0,96	0,82 \pm 0,29	0,96	0,73 \pm 0,51
10.03.2020	13.03.2020	0,99	0,97 \pm 0,48	0,99	0,94 \pm 0,33	0,99	0,75 \pm 0,52
	18.03.2020	0,99	0,84 \pm 0,42	0,99	0,95 \pm 0,33	0,99	0,97 \pm 0,67

*Примечание. Точная внесённая концентрация рассчитывалась исходя из чистоты соответствующих стандартов и суммарной массы навески масла и растворов стандартов.

Таким образом, для контроля работы детектора и адекватности градуировочного графика целесообразным представляется анализ контрольных проб в каждой последовательности неизвестных образцов [статья по методу].

4.1.5 Оценка метрологических характеристик разработанной методики

Оценка метрологических параметров разработанной методики проводилась по ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002¹¹, РМГ 61-2010¹², РМГ 76-2014¹³. Результаты представлены в табл. 4.1.5.1¹⁴, полный отчёт приведён в Приложении В.

Таблица 4.1.5.1 - Метрологическая оценка методики определения 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола методом ГХ/МС-МС.

		3-МХПД	2-МХПД	Глицидол
Диапазон определяемых концентраций	мг/кг	0,3-30,0	0,3-30,0	0,3-30,0
Точность (границы относительной погрешности)	$\pm\delta, \%$ (P=0,95)	50	35	69
Повторяемость (среднеквадратичное отклонение повторяемости)	$\sigma_p, \%$	9,4	9,2	9,2
Воспроизводимость (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости)	$\sigma_p, \%$	10,7	8,3	16,5
Межлабораторная повторяемость (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений)	r, %	26	26	26
Межлабораторная воспроизводимость (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях),	R, %, (P=0,95)	30	23	46
Средняя полнота извлечения вещества	%	113,6	107,9	87,5

В исследуемом диапазоне концентраций наибольшая величина погрешности определения была установлена для глицидола. Объясняется это тем, что окончательный результат 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 % [16].

В целом, новый вариант методики оказался более трудо- и времязатратным по сравнению с ISO 18363-2:2018. Однако, за счёт построения градуировочных прямых и анализа контрольных проб, новый вариант методики позволяет добиться более точных результатов определения всех аналитов, а также своевременно выявлять и корректировать ошибки при подготовке проб и сбое в работе ГХ/МС-МС системы.

¹¹ ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. — М.: Стандартинформ, 2009. — 24 с.

¹² РМГ 61-2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. — М.: Стандартинформ, 2013. — 62 с.

¹³ РМГ 76-2014 ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа. — М.: Стандартинформ, 2013. — 114 с.

¹⁴ МУК 4.1.3547-19 Определение содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и животных жирах. 2019. — 17 с.

4.2 Исследование содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в различных пищевых маслах и жирах

В период 2019-2021 годов было исследовано 86 образцов различных пищевых масел, жиров и их фракций, подвергавшихся различной обработке (рафинация, дезодорация, жарка во фритюре и т.д.) а также масложировых смесей (заменители молочного жира, жиры специального назначения) и эмульсионных продуктов (специализированные масложировые продукты, спреды и маргарины). Полученные результаты по содержанию 3-МХПДЭ, 2-МХПДЭ и ГЭ в пересчёте на свободные формы представлены в таблице 4.2.1 [12]. Образцы сгруппированы согласно принадлежности к соответствующему типу; жирным шрифтом выделено содержание глицидола, превышающее запланированный норматив 1 мг/кг для растительных масел и жиров, не предназначенных для производства детского питания. Для эмульсионных жировых продуктов результаты представлены в мг/кг жировой части продукта.

Таблица 4.2.1 - Содержание эфиров монохлорпропандиола и глицидиловых эфиров в пересчете на свободные формы в различных пищевых маслах и жирах (мг/кг). Способы очистки или обработки масла: В – вымороженное, Д-дезодорированное, Н – нерафинированное, О – отбеленное, Р-рафинированное, Ф-фильтрованное, ХО – холодный отжим. Результаты представлены в виде среднего (М) из числа параллельных измерений (n), RSD – абсолютное стандартное отклонение, R, % - степень извлечения.

№	Дата выработки	Очистка (экстракция)	Описание	Жирность	n	Содержание 3-МХПД, мг/кг масла (жира)			Содержание 2-МХПД, мг/кг масла (жира)			Содержание глицидола, мг/кг масла (жира)		
						Среднее	RSD	R, %	Среднее	RSD	R, %	Среднее	RSD	R, %
Подсолнечные масла														
1	2019	РДВ	Подсолнечное высокоолеиновое "для фритюра" свежее	-	3	<0,10	-	93	<0,10	-	80	0,53 ¹	0,18	59
2	2019	РДВ	Подсолнечное высокоолеиновое "для фритюра", после фритюра	-	3	0,76	18+,1 1	93	0,42	0,15	80	0,55 ¹	0,16	59
3	2019	РДО	Подсолнечное	-	3	0,22	0,04	93	0,14	0,09	80	0,29 ¹	0,02	59
4	2019	РДВ	Подсолнечное	-	3	<0,10	-	96	<0,10 ¹⁵	-	60	0,41	0,13	105
5	?	РД	Подсолнечное	-	3	0,19	-	96	<0,10 ¹	-	60	0,53	0,04	105
6	?	РДВ	Подсолнечное	-	3	0,62	0,06	90	<0,10	-	81	0,47	0,06	79
7	?	?	Подсолнечное	-	3	1,85	0,05	84	0,67	0,18	81	0,58	0,05	78
8	?	РД	Подсолнечное	-	3	(<0,10) ²	-	90	<0,10 ¹	-	42	(0,29) ¹⁶	-	82
9	2019	РДВ	Подсолнечное	-	3	0,12	0,04	90	<0,10 ¹	-	42	<0,10	-	82
10	2019	РДВ	Подсолнечное	-	3	0,26	0,02	97	<0,10	-	87	0,61	0,05	125
11	?	?	Подсолнечное с добавлением оливкового	-	3	<0,10	-	97	<0,10	-	87	0,18	0,04	125
12	?	РДВ	Подсолнечное	-	3	<0,10	-	91	<0,10	-	81	0,34 ¹	0,03	58
13	?	?	Подсолнечное	-	2	<0,10	-	77	<0,10	-	79	0,62	0,01	81
14	2020	РДВ	Подсолнечное	-	2	(<0,10) ²	0,01	89	<0,10	-	89	(0,56) ²	0,01	80
15	2020	РД	Подсолнечное	-	1	(<0,10) ²	-	100	<0,10	-	92	(0,46) ²	-	76
Пальмовые масла и фракции														
1	2019	РД	Пальмовый oleин	-	3	2,41	0,41	93	1,35	0,46	80	0,83 ¹	0,11	59
2	2019	РД	Пальмовый oleин после использования во фритюре ¹⁷	-	3	6,61	0,76	93	2,69	1,56	80	0,63 ¹	0,16	59
3	?	РДО	Пальмовый стеарин	-	2	1,67	0,22	91	0,73	0,08	89	0,87	0,22	74
4	?	РДО	Пальмовый стеарин	-	2	<0,10	-	91	<0,10	-	89	0,12	0,17	74

¹⁵ Значение скорректировано по пробе с добавкой путём деления рассчитанной по хроматограмме величины на соответствующий % извлечения R и умножения полученного значения на 100.

¹⁶ Значение получено по пробе А. Обнаруженная концентрация в пробе Б меньше 0,03 мг/кг.

¹⁷ Температура фритюра < 180°C, время обработки около 8 ч

5	?	РДО	Пальмовый olein	-	2	3,56	0,06	91	1,52	0,02	89	0,65	0,13	74
6	?	РДО	Пальмовое масло	-	2	3,62	0,04	91	1,58	0,05	89	0,60	0,13	74
7	?	РДО	Пальмовое масло	-	2	<0,10	-	91	<0,10	-	89	<0,10	-	74
8	?	РДО	Пальмовое масло	-	2	0,17	0,13	91	<0,10	-	89	0,26	0,15	74
9	2019	РДО	Пальмовое масло	99,9%	3	0,95	0,04	88	0,42	0,02	96	1,38	0,40	98
10	?	РД	Пальмовое масло	-	3	2,36	0,13	88	1,09	0,04	96	6,29	2,66	98
11	?	РД	Пальмовое масло	-	2	2,75	0,02	77	1,24	0,03	79	1,92	0,07	81
12	?	РДО	Пальмовое масло	-	2	2,18	0,12	92	1,01	0,04	95	0,20	-	102
13	2020	РДО	Пальмовое масло	-	2	0,99	-	82	0,44	0,01	100	0,17	0,02	73
14	2020	Д (260°С)	Пальмовое масло	-	2	2,60	0,03	87	1,20	-	85	2,53	0,20	94
15	2020	Д (260°С)	Пальмовое масло	-	2	2,54	0,02	87	1,20	0,02	85	2,49	0,16	94
16	2020	?	Пальмовое масло	-	2	2,87	0,01	86	1,45	0,02	90	2,12	0,18	80
17	2020	?	Пальмовое масло	-	2	2,95	-	86	1,49	0,04	90	1,77	0,04	80
18	2020	РД	Пальмовое масло	-	1	2,79	-	94	1,36	-	98	0,41	-	94
Другие растительные масла														
1	2019	Н	Горчичное	-	3	<0,10	-	96	<0,10 ¹	-	60	<0,10	-	105
2	2018	Н	Горчичное	-	3	<0,10	-	97	<0,10	-	94	<0,10	-	75
3	2019	Н	Горчичное	-	3	<0,10	-	97	<0,10	-	94	<0,10	-	75
4	?	Р (ХО)	Оливковое	-	1	0,17	-	-	<0,10	-	-	<0,10	-	-
5	?	?	Оливковое	-	3	<0,10	-	90	<0,10 ¹	-	42	<0,10	-	82
6	?	Р	Рисовое	-	3	2,15	0,13	90	<0,10	-	81	1,04	0,18	79
7	?	РД	Кукурузное	-	3	1,23	0,08	90	<0,10	-	81	1,26	0,08	79
8	?	РД	Кукурузное	-	3	0,81	0,02	97	0,29	0,03	87	1,21	0,04	125
9	?	РД	Кукурузное	-	3	0,14	0,03	91	<0,10	-	81	0,28 ¹	0,06	58
10	?	Р	Масло виноградной косточки	-	3	0,83	0,03	91	0,34	0,04	81	0,18 ¹	0,04	58
11	2019	Н (ХО)	Конопляное	-	3	<0,10	-	97	<0,10	-	94	<0,10	-	75
12	?	?	Кокосовое	-	2	<0,10	-	77	<0,10	-	79	<0,10	0,01	81
13	2020	РД	Кокосовое	-	1	0,30	-	100	0,14	-	92	0,13	-	76
Жиры специального назначения														
1	2019	?	Жир кондитерский	-	3	3,42	0,90	96	1,66 ¹	0,31	60	8,30⁴	2,09	105
2	?	?	Жир кондитерский	-	1	1,08	-	90	0,56	-	88	0,45	-	77
3	?	?	Жир кондитерский	-	1	0,74	-	90	0,38	-	88	0,26	-	77
4	?	?	Жир кондитерский	-	1	0,91	-	90	0,46	-	88	0,43	-	77
5	?	?	Жир кондитерский	-	1	0,09	-	94	0,05	-	98	<0,10	-	94
6	?	?	Заменитель молочного жира	-	2	3,60	0,10	90	0,34	0,08	81	1,99	0,06	79
7	2019	?	Заменитель молочного жира	-	3	4,11	0,33	91	1,72	0,22	81	1,53¹	0,15	58
8	2019	?	Заменитель молочного жира	99,9%	3	2,11	0,04	97	0,97	0,19	94	0,61	0,15	75
9	2019	?	Заменитель молочного жира	99,9%	2	1,56	0,14	88	0,76	0,14	96	3,54	1,26	98
10	2019	?	Заменитель молочного жира	99,9%	3	1,47	0,01	88	0,68	0,03	96	1,87	0,05	98
11	2019	?	Заменитель молочного жира	99,9%	3	1,05	0,01	88	0,53	0,01	96	11,17	0,40	98

12	?	РД	Заменитель молочного жира	-	1	2,16	-	94	1,08	-	98	0,78	-	94
13	2020	?	Технологическое вспомогательное средство "специальный жир Унивакс»	-	2	(0,18) ²	0,03	89	<0,10	-	89	(0,22) ²	0,03	80
14	2020	?	Заменитель животного жира	-	3	2,65 ¹	0,07	68	0,88	0,03	78	4,29	0,42	70
15	2020	?	Заменитель масла какао	-	1	0,15	-	82	<0,10	-	100	<0,10	-	73
16	2020	?	Заменитель масла какао	-	2	<0,10	0,01	92	<0,10	0,01	91	<0,10	0,01	101
17	2020	?	Заменитель масла какао	-	2	0,10	-	92	<0,10	-	91	<0,10	0,02	101
18	2020	?	Заменитель масла какао	-	1	0,16	-	90	<0,10	-	88	<0,10	-	77
19	2020	?	Эквивалент масла какао	-	2	0,34	-	82	<0,10	-	100	0,20	-	73
20	2020	?	Эквивалент масла какао	-	1	0,68	-	90	0,35	-	88	0,11	-	77
Эмульсионные жировые продукты														
1	2019	?	Маргарин	40,0%	1	2,22	-	107	0,67		79	1,95	-	81
2	2019	?	Маргарин	48,0%	2	1,55	0,71	83	0,70	0,09	99	0,84	0,07	82
3	2019	?	Маргарин	48,0%	2	1,56	0,78	83	0,69	0,27	99	0,83	0,15	82
4	2019	?	Маргарин	83,0%	2	<0,10	-	83	<0,10	-	99	0,15	0,22	82
5	2019	?	Маргарин	83,0%	2	<0,10	-	83	<0,10	-	99	0,25	0,36	82
6	2019	?	Маргарин	82,5%	3	4,21	0,29	107	2,28	0,39	79	3,56	0,11	81
7	2020	?	Маргарин	-	2	1,66	0,01	92	0,80	0,01	91	1,58	0,41	101
8	2020	?	Маргарин	82%	1	2,89	-	92	1,32	-	91	2,82	-	101
9	2020	?	Маргарин	-	1	2,55	-	94	1,25	-	98	0,43	-	94
10	2020	?	Маргарин	-	1	1,77	-	94	0,86	-	98	0,48	-	94
11	2020	?	Маргарин	82%	1	3,06	-	121	1,46	-	104	0,73	-	86
12	2019	?	Спред растительно-жировой	72,0%	3	3,75	0,18	107	1,59	0,27	79	0,39	0,02	81
13	2019	?	Спред растительно-жировой	72,5%	3	5,03	0,40	107	2,50	0,34	79	1,15	0,10	81
14	2019	?	Спред растительно-жировой	72,5%	3	1,57	0,15	91	0,73	0,14	89	2,49	0,34	74
15	2019	?	Спред растительно-жировой	82,5%	2	1,80	0,11	74	0,90 ¹	0,04	62	1,88 ¹	0,50	68
16	2020	?	Растительно-сливочный продукт	82,5%	2	0,73	0,02	74	0,30 ¹	0,07	62	1,11 ¹	0,14	68
17	2019	?	Спред растительно- сливочный	70,0%	2	0,82	0,23	83	0,41	0,15	99	0,64	0,26	82
18	2019	?	Спред растительно- сливочный	70,0%	3	0,41	0,02	88	0,36	0,27	96	0,71	0,18	98
19	?	?	Спред растительно- сливочный	72,5%	3	1,55	0,03	74	0,98 ¹	0,03	62	2,67 ¹	0,41	68
20	?	?	Спред растительно- сливочный	82,5%	3	1,34	0,00	74	1,01 ¹	0,01	62	2,13 ¹	0,29	68

Представленные данные характеризуют содержание эфиров монохлорпропандиола и глицидиловых эфиров в пересчёте на свободные формы в однокомпонентных маслах, жирах и составных масложировых продуктах, которые прошли в основном одну или более ступеней высокотемпературной очистки. В целом, содержание всех анализов в исследованных образцах, которые подвергались какой-либо очистке, не зависело ни друг от друга, ни от типа такой очистки. Однако, содержание 3-МХПДЭ в пересчёте на 3-МХПД гораздо чаще было выше, чем содержание глицидиловых эфиров. Это может говорить о создании более благоприятных условий для образования 3-МХПДЭ при рафинации и дезодорации, чем для образования глицидиловых эфиров в таких маслах и жирах как пальмовые масла и их фракции, жиры специального назначения и эмульсионные жировые продукты. Это, однако, не было характерно для группы подсолнечных масел, где медианное содержание глицидиловых эфиров было 0,47 мг/кг, а эфиров 3-МХПД – 0,1 мг/кг.

Из 86 исследованных образцов 27 (около трети) содержали глицидиловых эфиров больше 1 мг/кг – это часть пальмовых масел, рисовое и кукурузные масла, часть заменителей молочного и животного жира, маргаринов, спредов и один из кондитерских жиров. Стоит отметить, что количество всех контаминантов, в т.ч. глицидиловых эфиров в пересчёте на глицидол во всех исследованных рафинированных и дезодорированных подсолнечных маслах (за исключением одного образца) не превышало 1 мг/кг, в т.ч. даже после использования в качестве фритюрного жира. Кроме того можно отметить, что использование в качестве фритюрного жира подсолнечного высокоолеинового масла и одного образца пальмового олеина (температура фритюра <180 °С, время нагрева около 8 ч) практически не изменила или изменила незначительно содержание глицидиловых эфиров, в то время как содержание 3-МХПДЭ в подсолнечном масле выросло в 12 раз (с 0,06 мг/кг до с 0,76 мг/кг в пересчёте на 3-МХПД), а в пальмовом олеине почти в 3 раза (с 2,41 мг/кг до с 6,61 мг/кг в пересчёте на 3-МХПД).

В целом полученные в настоящей работе данные согласуются с данными зарубежных исследований. Считается, что рафинированные растительные масла, особенно пальмовое масло, обладают наиболее высокими концентрациями глицидиловых эфиров среди остальных масел [297]. В случае масел и жиров, произведённых в основном на территории Российской Федерации, высокая концентрация глицидиловых эфиров была обнаружена не только в пальмовых маслах, но главным образом в масложировых продуктах, изготавливаемых на его основе: заменителях молочного жира, маргаринах, спредах и в одном из кондитерских жиров.

Вероятно, это связано с особенностями производства таких продуктов, при которых могут создаваться благоприятные условия для образования технологических контаминантов: использование растительных масел и их фракций, содержащих как готовые контаминанты, так и их прекурсоры (ди-, моноглицериды, органические и/или неорганические хлорсодержащие соединения), эмульгаторы – моно- и диглицериды жирные кислоты, воду, хлорид натрия и др. Также имеет значение температурный режим производства и продолжительность температурной обработки сырья и готового продукта.

Интересно, что заменители масла какао (ЗМК) всех типов практически не содержали или содержали мало исследуемых контаминантов: практически столько же, сколько было обнаружено в очищенных подсолнечных маслах и неочищенных растительных маслах непальмового типа. В производстве ЗМК обычно используют рафинированные масла, к которым относятся кокосовое и пальмоядровое масла (лауриновые ЗМК нетемператуемого типа, CBS), пальмовое, соевое или хлопковое масла (нелауриновые ЗМК нетемператуемого типа, CBR) или тропические масла, такие как пальмовое, масло иллипе, ши, кокум и масло семян шореи (*Shorea robusta*) (эквиваленты масла какао, CBE) [41]. Производство подобных продуктов может включать технологические процессы гидрогенизации, переэтерификации и фракционирования для достижения физических свойств заменителя идентичных либо схожих с таковыми у дорогого масла какао. Несмотря на потенциально высокую вероятность образования контаминантов в заменителях масла какао, обнаруженные концентрации 3-МХПДЭ, 2-МХПДЭ и ГЭ, вероятно, говорят либо об отсутствии или низком содержании предшественников данных веществ в исходных маслах, либо об использовании такой технологической обработки, которая позволила нивелировать образование и накопление эфиров монохлорпропандиолов и глицидиловых эфиров в конечном продукте.

В настоящей работе в основном проводился анализ масел и жиров, подвергавшихся тепловой обработке (рафинированных и/или дезодорированных). В исследовании было также проанализировано меньшее количество нерафинированных масел, таких как горчичное и конопляное, и в них было обнаружено самое низкое содержание всех контаминантов из всех проанализированных образцов, что согласуется с данными аналогичных исследований [172].

4.2.1 Содержание 3-МХПДЭ в маслах, жирах и маложировых продуктах различного происхождения и способа обработки.

Все исследованные масла были объединены по типам, сравнительное содержание эфиров 3-МХПД в некоторых из них в пересчёте на свободную форму представлено на рисунке 4.2.1.1:

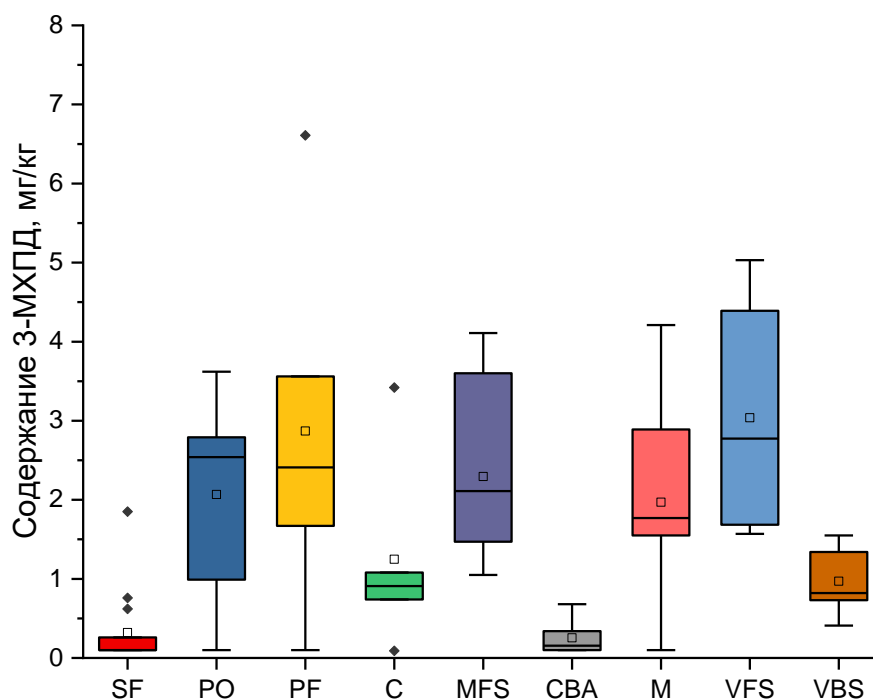


Рис. 4.2.1.1 – Содержание эфиров 3-МХПД в пересчёте на свободную форму в разных типах масел, мг/кг масла. SF – подсолнечные масла, n=15, PO – пальмовые масла, n=13, PF – фракции пальмового масла, n=5, C – кондитерские жиры, n=5, MFS – заменители молочного жира, n=7, CBA – заменители какао масла разных типов, n=6, M – маргарины, n=11, VFS – спреды растительно-жировые, n=4, VBS – спреды растительно-сливочные, n=5. Квадрат представляет собой диапазон Q25-Q75, длина усов $1,5 \cdot \text{IQR}$ (межквартильный диапазон), «—» – медиана, «□» – среднее, «♦» – выбросы.

Практически все исследованные *подсолнечные масла* подвергались рафинации и дезодорации, при этом содержание 3-МХПД почти во всех случаях не превышало единицы, т.ч. и после фритюрной обработки: диапазон полученных значений составил $<0,10$ мг/кг – $0,76$ мг/кг (диапазон Q1-Q3 $<0,10$ мг/кг – $0,26$ мг/кг). Только в одном из масел с не установленной очисткой было обнаружено $1,85 \pm 0,05$ мг/кг 3-МХПД.

Содержание 3-МХПД в других однокомпонентных непальмовых маслах значительно варьировало в зависимости от типа масла и его очистки: так, меньше всего 3-МХПД было найдено в *нерафинированных горчичных, конопляном маслах, рафинированном оливковом масле и оливковом масле не установленной очистки* – $<0,10$ мг/кг. Во всех исследованных *кукурузных маслах* количество 3-МХПД было разным: $0,14$ мг/кг – $1,23$ мг/кг.

Содержание 3-МХПД в *пальмовых маслах и их фракциях* варьировало в диапазоне от $<0,10$ мг/кг до $3,62$ мг/кг и от $<0,10$ мг/кг– $6,61$ мг/кг соответственно. При этом основная масса значений в пальмовом масле находилась в диапазоне $0,99$ мг/к– $2,79$ мг/кг (медианное значение $2,54$ мг/кг), а во фракциях пальмового масла $1,67$ мг/кг– $3,56$ мг/кг (медиана $2,41$ мг/кг). Полученные данные, вероятно, согласуются с результатами недавней работы, где было показано, что 3-МХПДЭ, а также 2-МХПДЭ и ГЭ, при

фракционировании пальмовых масел преимущественно попадают в жидкую фракцию, степень ненасыщенности которой выше [258]. Так, среднее содержание 3-МХПД в пальмовых маслах составило 1,67 мг/кг, что меньше, чем среднее содержание 3-МХПД в пальмовом олеине (2,99 мг/кг без учёта масла после фритюра) и больше, чем в пальмовом стеарине (среднее 0,89 мг/кг). К сожалению, невысокое количество проанализированных образцов фракций пальмовых масел не позволяет оценить достоверность данной тенденции в этой работе.

В группе *жиров специального назначения* были проанализированы отдельно кондитерские жиры (шортенинги), заменители молочного жира и заменители масла какао разных типов. Интересно, что самыми высокими значениями 3-МХПД в этой группе характеризовались заменители молочного жира, диапазон Q1-Q3 которых составил 1,47 мг/кг -3,60 мг/кг, что схоже с таковым у фракций пальмовых масел. Аналогичные диапазоны у кондитерских жиров и ЗМК составили всего 0,74 мг/кг -1,08 мг/кг (медиана 0,91 мг/кг) и <0,1 мг/кг -0,34 мг/кг (медиана 0,15) соответственно. Вероятно, подобная разница может свидетельствовать о разной доле пальмового масла или его фракций в составе этих продуктов.

Эмульсионные жировые продукты в целом содержали больше 3-МХПДЭ в составе по сравнению со всем остальными маслами и жировыми продуктами. В этой группе наименьшее содержание 3-МХПДЭ было найдено в образцах растительно-сливочных спредов: 0,41 мг/кг-1,55 мг/кг со средним значением 0,97 мг/кг и медианой 0,82 мг/кг в пересчёте на свободную форму. В 11 исследованных образцах маргаринов 75% значений лежало в диапазоне 1,55 мг/кг -2,89 мг/кг, что сравнимо с соответствующим диапазоном пальмовых масел. Среднее и медианное значения в данном случае также были близки: 1,97 мг/кг и 1,77 мг/кг соответственно. Однако, больше всего 3-МХПДЭ в виде 3-МХПД было найдено в растительно-жировых спредах, общий разброс полученных значений составил в этой подгруппе 1,57 мг/кг-5,03 мг/кг, а среднее и медианное значения составили 3,04 мг/кг и 2,77 мг/кг соответственно. Тем не менее, количество проанализированных образцов не позволяет сделать надёжных выводов о преимущественном содержании 3-МХПДЭ именно в эмульсионных жировых продуктах по сравнению с остальными жировыми продуктами и маслами.

4.2.2 Содержание 2-МХПД в маслах, жирах и маложировых продуктах различного происхождения и способа обработки.

Полученные данные по содержанию эфиров 2-МХПД в маслах, объединённых по типам, представлены на рисунке 4.2.2.1:

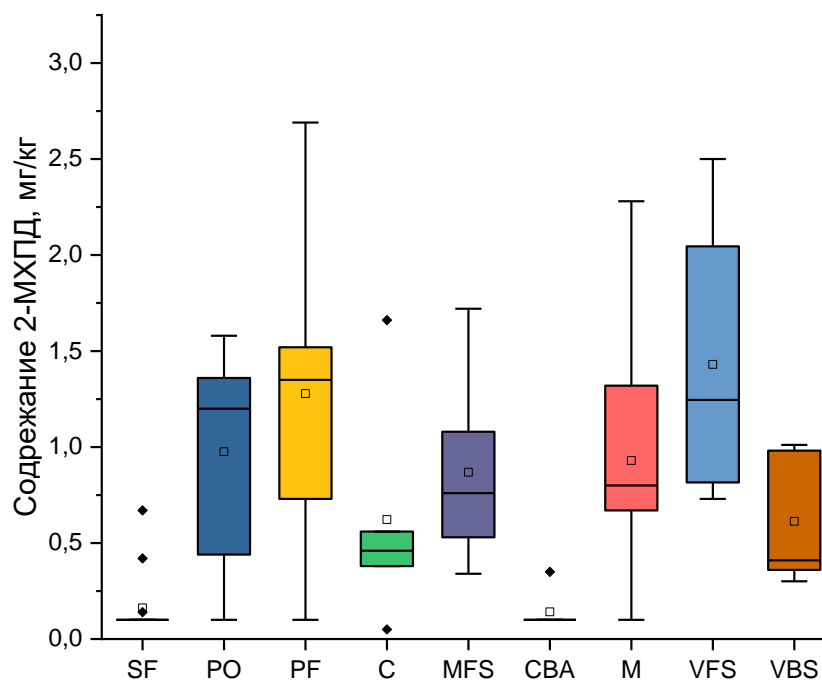


Рис. 4.2.2.1 – Содержание эфиров 2-МХПД в пересчёте на свободную форму в разных типах масел, мг/кг масла. SF – подсолнечные масла, n=15, PO – пальмовые масла, n=13, PF – фракции пальмового масла, n=5, C – кондитерские жиры, n=5, MFS – заменители молочного жира, n=7, CBA – заменители какао масла разных типов, n=6, M – маргарины, n=11, VFS – спреды растительно-жировые, n=4, VBS – спреды растительно сливочные, n=5. Квадрат представляет собой диапазон Q25-Q75, длина усов $1,5 \cdot \text{IQR}$ (межквартильный диапазон), «—» – медиана, «•» – среднее, «♦» – выбросы.

Аналогично данным одних зарубежных исследований [258], и в противоположность другим [172], содержание 2-МХПДЭ во всех исследованных маслах и жирах практически всегда составляло половину содержания 3-МХПДЭ: наиболее простое возможное объяснение этого факта состоит в том, что хлорид-ион чаще присоединяется ко внешним углеродам 1-го и 3-го положения в глицеридном скелете, нежели к углероду 2-го положения [258]. Так, в исследованных подсолнечных маслах соотношение 3-МХПД/2-МХПД было 1,6-2,8, в пальмовых маслах и их фракциях 1,8-2,5, других растительных маслах 2,1-2,8, в жирах специального назначения 1,9-3,0 (за исключением одного образца, соотношение аналитов в котором составило 10,6), в ЭЖП – 1,1-3,3. Образцы, для которых по какому-либо из аналитов было получено значение $<0,10$ в расчётах не участвовали.

В подсолнечных маслах любой обработки содержание 2-МХПДЭ в пересчёте на 2-МХПД практически всегда было менее 0,10 мг/кг за исключением нескольких образцов. В пальмовых маслах и фракциях пальмовых масел 75% всех измеренных концентраций лежали в схожих диапазонах 0,44 мг/кг-1,36 мг/кг (среднее 1,2 мг/кг) и 0,73 мг/кг-1,52 мг/кг (среднее 1,35 мг/кг) соответственно. В группе жиров специального назначения прослеживалась аналогичная предыдущему пункту 4.2.1 тенденция по содержанию 2-МХПДЭ в подгруппах жиров. Так, больше всего 2-МХПД было обнаружено в

заменителях молочного жира 0,34 мг/кг-1,72 мг/кг (среднее значение 0,87 мг/кг) и в кондитерских жирах <0,10 мг/кг-1,66 мг/кг (среднее значение 0,62 мг/кг). Заменители масла какао, аналогично подсолнечным маслам, практически не содержали 2-МХПДЭ.

Среди эмульсионных масло-жировых продуктов меньше всего 2-МХПДЭ ожидаемо обнаруживалось в сливочно-растительно спредах (0,3 мг/кг -1,01 мг/кг), содержание которого, вероятно, зависело от доли растительных масел в составе, а в маргаринах и растительно-жировых спредах содержание 2-МХПДЭ было близким и примерно в 2 раза выше, чем в СРС (<0,1 мг/кг-2,28 мг/кг и 0,73 мг/кг-2,5 мг/кг соответственно).

4.2.3 Содержание глицидола в маслах, жирах и маложировых продуктах различного происхождения и способа обработки.

Полученные данные по содержанию эфиров глицидола в маслах, объединённых по типам, представлены на рисунке 4.2.3.1:

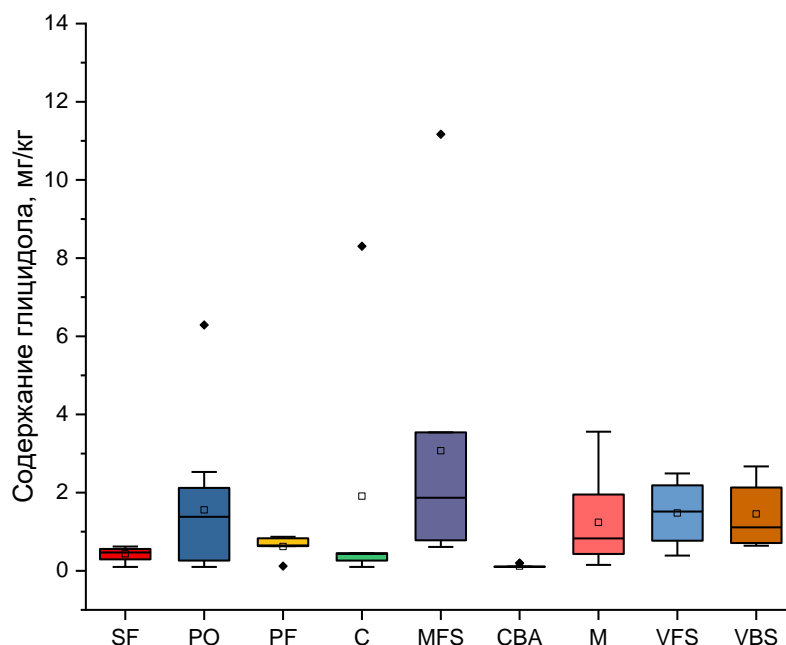


Рис. 4.2.3.1 – Содержание эфиров глицидола в пересчёте на свободную форму в разных типах масел, мг/кг масла. SF – подсолнечные масла, n=15, PO - пальмовые масла, n=13, PF – фракции пальмового масла, n=5, С – кондитерские жиры, n=5, MFS – заменители молочного жира, n=7, СВА – заменители какао масла разных типов, n=6, М – маргарины, n=11, VFS - спреды растительно-жировые, n=4, VBS - спреды растительно сливочные, n=5. Квадрат представляет собой диапазон Q25-Q75, длина усов 1,5*IQR (межквартильный диапазон), «—» - медиана, «□»- среднее, «♦» - выбросы. Пунктирная линия соответствует нормативу содержания глицидола в маслах и жирах не для детского питания.

Технологические режимы очистки исследованных *подсолнечных масел* (рафинация, дезодорация, вымораживание, отбелка и их комбинации) не вызывали интенсивного

образования глицидола: его содержание составило $<0,1$ мг/кг - $0,61$ мг/кг (среднее $0,43$ мг/кг).

Согласно зарубежным исследованиям, содержание глицидиловых эфиров в *пальмовых маслах* обычно ниже, чем в пальмовом олеине и выше, чем в пальмовом стеарине [258]. В данной работе похожая тенденция была обнаружена для 2- и 3-МХПДЭ (см. пункты 4.2.1 и 4.2.2), но не для глицидиловых эфиров. Так, 75% всех результатов по пальмовому маслу находились в пределах $0,33$ мг/кг- $2,30$ мг/кг (среднее $1,68$ мг/кг), тогда как различные фракции ПМ содержали всего $0,63$ мг/кг- $0,83$ мг/кг (среднее $0,62$ мг/кг). Возможно, это объясняется недостаточностью проанализированных образцов фракций пальмового масла.

В группе *жиров специального назначения* исследованные группы продуктов также сильно отличались по содержанию глицидиловых эфиров, как и по содержанию 2- и 3-МХПДЭ. Больше всего глицидола было обнаружено в заменителях молочного жира – $0,61$ мг/кг - $3,54$ мг/кг (медиана $1,87$ мг/кг), в одном из образцов содержание глицидола составило $11,2$ мг/кг. В кондитерских жирах количество глицидола было в основном в диапазоне $<0,1$ мг/кг - $0,45$ мг/кг, но в одном из образцов было обнаружено $8,3$ мг/кг глицидола. Уровень глицидола во всех исследованных заменителях масла какао не превышал $0,2$ мг/кг.

В отличие от группы жиров специального назначения в *группе эмульсионных жировых продуктов* наблюдались более близкие диапазоны содержания ГЭ. Так, в маргаринах Q1-Q3 составил $0,43$ мг/кг - $1,95$ мг/кг (медиана $0,83$ мг/кг), в РЖС $0,77$ мг/кг- $2,18$ мг/кг (медиана $1,51$ мг/кг), в СРС $0,71$ мг/кг - $2,13$ мг/кг (медиана $1,11$ мг/кг), что в целом ниже, чем в пальмовых маслах и заменителях молочного жира.

В целом наиболее сильно по содержанию глицидола выделилась группа эмульсионных жировых продуктов, а также пальмовые масла и заменители молочного жира.

4.3 Ориентировочная оценка поступления эфиров монохлорпропандиолов и глицидиловых эфиров с маслами и жирами рациона населения РФ

На основании полученных данных, а также открытых данных Росстата по потреблению растительных масел и масложировых продуктов населением России за 2018-2020 г.г. были рассчитаны ориентировочные уровни поступления эфиров 3-МХПД и глицидиловых эфиров в пересчете 3-МХПД и глицидол (таблица 4.3.1). Предельно допустимая нагрузка 3-МХПД (tolerable daily intake, TDI), установленная Европейским агентством по безопасности продуктов питания, составляет 2 мкг/кг м.т./сутки. Она соответствует количеству 3-МХПД, которое можно употреблять ежедневно в течение всей

жизни без заметного риска для здоровья. Для оценки риска потребления глицидола и его эфиров считают т.н. предел воздействия (margin of exposure, MoE), который определяется как отношение между значением BMDL10¹⁸, и найденной величиной поступления канцерогена с пищей. Принято, что значения ниже 25000 MoE свидетельствуют о риске для здоровья.

Таблица 4.3.1 - Приблизительная оценка поступления эфиров 3-МХПД и глицидиловых эфиров с растительными маслами и масложировыми продуктами населению России. Среднее содержание контаминантов в категории «растительные масла» считали по данным для подсолнечных, пальмовых и других монокомпонентных масел, а в категории масложировых продуктов – по данным для маргаринов и всех спредов.

	2018	2019	2020	Среднее содержание 3-МХПД	Среднее содержание глицидола
Потребление растительных масел в России по данным Росстата, кг/чел/год	9,90	9,80	9,70		
Потребление растительных масел в России, г/чел/день	27,1	26,8	26,6	1,05 мг/кг	0,80 мг/кг
Потребление масложировых продуктов в России по данным Росстата, кг/чел/год	0,8	0,8	0,8		
Потребление масложировых продуктов в России, г/чел/день	2,2	2,2	2,2	1,85 мг/кг	1,35 мг/кг
				TDI (3-МХПД)	MoE (глицидол)
Суммарное поступление 3-МХПД за счет растительных масел и масложировых продуктов рациона, мкг/кг м.т./сут для человека массой 65 кг	0,50	0,50	0,49	2	
Суммарное поступление глицидола за счет растительных масел и масложировых продуктов рациона, мкг/кг м.т./сут для человека массой 65 кг	0,38	0,38	0,37		
MoE, рассчитанная по суммарному поступлению глицидола за счет растительных масел и масложировых продуктов рациона, мкг/кг м.т./сут для человека массой 65 кг	6304	6368	6433		<25000

Полученные результаты свидетельствуют о наличии риска для здоровья, связанного с поступлением глицидиловых эфиров из монокомпонентных масел и масложировых продуктов рациона.

4.4 Исследование зависимостей содержания эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола от степени очистки подсолнечного масла

Содержание 2-МХПДЭ, 3-МХПДЭ и глицидиловых эфиров исследовали в зависимости от степени очистки подсолнечного масла и в процессе его хранения в климатическом шкафу. Для этого использовали подсолнечные масла 2018 и 2019 гг. производства, которые последовательно подвергались дезодорации согласно таблицам 2.1.1.2 и 2.1.2.1. На рисунке 4.4.1 изображён график изменения количества эфиров МХПД и глицидиловых эфиров в зависимости от глубины очистки подсолнечных масел, произведённых в 2018 и 2019 гг. Данные выражены в виде среднего ± δ:

¹⁸ BMDL10 – представляет собой нижний доверительный предел эталонной дозы для увеличения частоты неблагоприятных эффектов для организма на 10 % при потреблении канцерогена.

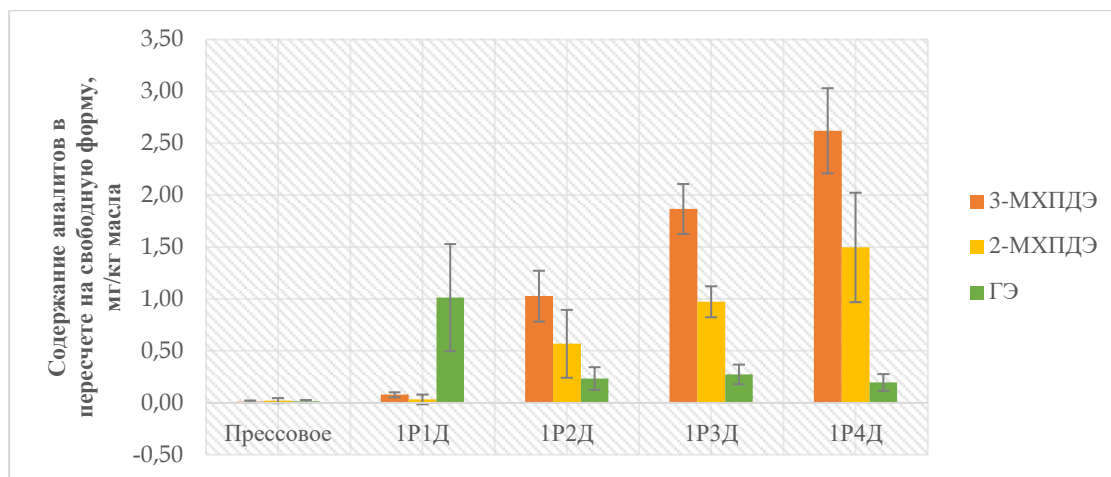


Рис. 4.4.1 – Изменение содержания эфиров монохлорпропандиолов и глицидиловых эфиров в подсолнечных маслах в зависимости от количества циклов рафинации и дезодорации. Исследованные масла: Р-рафинированное, Д-дезодорированное; цифра перед «Р» означает количество рафинаций, цифра перед «Д» - количество дезодораций.

Из представленных результатов видно, что неочищенное подсолнечное масло не содержало исследуемых аналитов в достоверно обнаруживаемых концентрациях. Затем рафинация и дезодорация незначительно увеличили содержание монохлорпропандиолов; после второй дезодорации содержание 3-МХПДЭ в пересчёте на 3-МХПД выросло до $1,03 \text{ мг/кг} \pm 0,25 \text{ мг/кг}$ и впоследствии продолжало постепенно расти до $1,87 \text{ мг/кг} \pm 0,24 \text{ мг/кг}$ (1P3Д) и $2,62 \text{ мг/кг} \pm 0,41 \text{ мг/кг}$ (1P4Д). Концентрация 2-МХПДЭ в пересчёте на 2-МХПД показывала аналогичную динамику, хотя на каждом этапе была примерно в два раза ниже содержания 3-МХПД. Так, первая дезодорация лишь незначительно увеличила концентрацию аналита, после второй было обнаружено $0,57 \text{ мг/кг} \pm 0,22 \text{ мг/кг}$ 2-МХПД, после третьей $0,97 \text{ мг/кг} \pm 0,15 \text{ мг/кг}$, а после четвертой $1,50 \text{ мг/кг} \pm 0,53 \text{ мг/кг}$. В связи с этим при наличии требования об обязательной обработке масел растительных после транспортировки наливом (минимум о проведении одной дезодорации), следует ограничить число возможных очисток масел и/или использовать для переработки и производства пищевых продуктов масла с низким содержанием предшественников эфиров МХПД – частичных ацилглицеридов и хлорсодержащих соединений. Это необходимо для того, чтобы закупленные за рубежом и переработанные растительные масла и жиры могли соответствовать нормативу по содержанию эфиров 3-МХПД и пересчёте на свободный 3-МХПД $1,25 \text{ мг/кг}$, который вступил в силу 1 января 2021 года [72].

Динамика концентраций глицидиловых эфиров в исследованных маслах была иной: первая рафинация и дезодорация увеличили практически в 10 раз содержание глицидола - до $1,01 \text{ мг/кг} \pm 0,52 \text{ мг/кг}$. Однако, следующая очистка снизила концентрацию

аналита до $0,23 \text{ мг/кг} \pm 0,11 \text{ мг/кг}$ и затем его содержание оставалось постоянным независимо от количества дезодораций.

Хранение образцов масел в климатической камере ожидаемо не оказало значимого влияния на содержание технологических контаминантов (рис. 4.4.2):

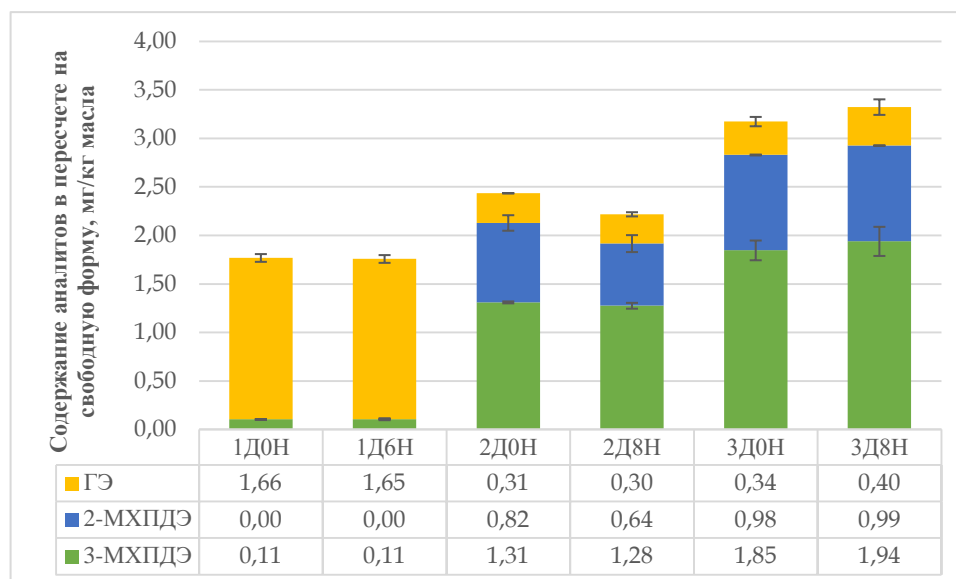


Рис. 4.4.2 – Сравнение концентраций эфиров монохлорпропандиолов и глицидиловых эфиров в пересчёте на свободные формы в зависимости от глубины очистки и длительности хранения в климатическом шкафу. Исследованные масла: Д- дезодорированное, Н - неделя; цифра перед «Д» означает количество дезодораций, цифра перед «Н» - количество недель хранения в климатическом шкафу. Значения представлены в виде среднего из 3 параллельных определений $\pm \delta$

Таким образом можно сделать предположение о наличии определенной связи между количеством дезодораций пищевого подсолнечного масла и содержанием технологических контаминантов 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола. Полученные данные свидетельствуют о значительной разнице в предпосылках и путях образования эфиров монохлорпропандиолов и глицидола [15].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Оптимизированы условия метода длительной щелочной переэтерификации с ГХ-МС/МС-детектированием для определения эфиров 3-МХПД, 2-МХПД и глицидиловых эфиров в пищевых маслах, жирах и масложировых продуктах. Были подобраны пары ионов предшественник-фрагмент для детектирования аналитов и их дейтерированных аналогов; было введено использование градуировочных прямых и контрольной пробы в каждой последовательности неизвестных образцов для более точного количественного анализа. Проведена метрологическая аттестация разработанной методики, в результате которой установлен диапазон определяемых концентраций 0,3 мг/кг -30 мг/кг для каждого из аналитов; точность измерения аналитов была 50% для 3-МХПД, 35% для 2-МХПД и 69% для глицидола. Средняя полнота извлечения вещества составила 113,6%, 107,9% и 87,5% соответственно для 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола.

2. Исследовано содержание эфиров монохлорпропандиолов и эфиров глицидола в различных пищевых маслах и жирах. Установлено, что наибольшее содержание 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола было отмечено в составных жировых продуктах: <0,10 мг/кг – 5,03 мг/кг, <0,10 мг/кг – 2,50 мг/кг и <0,10 мг/кг – 11,17 мг/кг соответственно. Содержание 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в пальмовых маслах и фракциях составило <0,10 – 6,61 мг/кг, <0,10 – 2,69 мг/кг и <0,10 – 6,29 мг/кг. Содержание глицидола в подсолнечных маслах колебалось от <0,10 мг/кг до 0,62 мг/кг, содержание 3-МХПД – от <0,10 мг/кг до 1,85 мг/кг, а 2-МХПД – от <0,10 мг/кг до 0,67 мг/кг. В нерафинированных оливковых и горчичных маслах эфиры монохлорпропандиолов и глицидола практически отсутствовали [12].

3. Исследовано содержание эфиров монохлорпропандиолов и эфиров глицидола в подсолнечных маслах разной глубины очистки и длительности хранения в климатическом шкафу в условиях нефорсированного окисления. Установлено, что на содержание исследованных контаминантов значимо влияло только количество дезодораций: так, содержание 3-МХПД и 2-МХПД в исследованных маслах росло с каждой очисткой (особенно сильно после второй очистки). Содержание глицидола наиболее значимо выросло после первой дезодорации, а затем снизилось и оставалось на одном уровне.

4. Хранение в климатическом шкафу в условиях нефорсированного окисления не оказывало влияния на содержание исследуемых аналитов.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Показано, что определение вторичных продуктов окисления (альдегидов, кетонов, эпоксидов и др.) предоставляет более подробную информацию для оценки окислительного статуса пищевых масел, чем традиционно определяемые перекисное и анизидиновое числа.

2. Установлено, что проведение дополнительных очисток пищевых подсолнечных масел методом дезодорации (более одной дезодорации) может повышать содержание в них вредных для здоровья человека соединений, таких как транс-изомеры жирных кислот, ненасыщенные альдегиды и эфиры монохлорпропандиолов, способствовать образованию потенциально канцерогенных веществ, например 1,2-эпоксибутана. С увеличением количества дезодораций в профиле летучих веществ подсолнечных масел увеличивается количество соединений с установленным классом опасности по СанПиН 1.2.3685-21.

3. Установлено, что наибольший риск образования эфиров глицидола связан с первой дезодорацией растительного масла, поэтому для первой дезодорации должны быть соблюдены условия, снижающие риски образования этого канцерогенного вещества.

4. Установленный уровень глицидиловых эфиров в исследованных монокомпонентных маслах и масложировых продуктах, представленных на российском рынке, может свидетельствовать о наличии риска для здоровья при потреблении этих продуктов.

5. Твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ) с ГХ-МС/ПВД является наиболее информативным методом регистрации и идентификации летучих веществ, характеризующих аромат пищевых масел и жиров. Экспериментально определены оптимальные условия экстракции всего спектра летучих соединений с одновременным предотвращением возможного образования вторичных продуктов окисления.

6. Разработан метод определения содержания эфиров МХПД и глицидиловых эфиров в пищевых маслах, жирах и масложировых продуктах методом длительной щелочной переэтерификации с газовой хроматографией и тандемным масс-спектрометрическим детектированием. На основании этих данных разработана метрологически аттестованная методика с диапазоном определяемых концентраций 0,3 мг/кг -30 мг/кг для каждого из аналитов. Точность измерения составила 50% для 3-МХПД, 35% для 2-МХПД и 69% для глицидола.

7. Исследовано содержание эфиров монохлорпропандиолов и эфиров глицидола в различных пищевых маслах и жирах. Установлено, что наибольшее содержание 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола было в составных жировых продуктах: <0,10

мг/кг – 5,03 мг/кг, <0,10 мг/кг – 2,50 мг/кг и <0,10 мг/кг – 11,17 мг/кг соответственно. Содержание 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола в пальмовых маслах и фракциях составило <0,10 – 6,61 мг/кг, <0,10 – 2,69 мг/кг и <0,10 – 6,29 мг/кг. Содержание глицидола в подсолнечных маслах колебалось от <0,10 мг/кг до 0,62 мг/кг, содержание 3-МХПД – от <0,10 мг/кг до 1,85 мг/кг, а 2-МХПД – от <0,10 мг/кг до 0,67 мг/кг. В нерафинированных и оливковых и горчичных маслах эфиры монохлорпропандиолов и глицидола практически отсутствовали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы свидетельствуют на примере подсолнечного масла о том, что проведение дополнительных дезодораций (более одной дезодорации) может снижать окислительную устойчивость пищевых масел, повышать содержание в них вредных для здоровья человека соединений, таких как транс-изомеры жирных кислот, ненасыщенные альдегиды и эфиры монохлорпропандиолов. При этом первая дезодорация подсолнечного масла обуславливает самое высокое содержание глицидиловых эфиров жирных кислот по сравнению с прессовым подсолнечным маслом и маслами, дезодорированными более 1 раза.

Исследование образцов однокомпонентных масел, жиров и масложировых смесей, представленных на российском рынке, показало наличие различных уровней контаминации МХПДЭ и ГЭ. Особенно высокое содержание этих соединений было зарегистрировано в составных масложировых продуктах, что может быть связано с наличием рафинированных дезодорированных масел, в частности пальмовых, в составе этих продуктов и предшественников контаминантов (частичных ацилглицеридов и соединений хлора), а также неоптимальными технологическими процессами и/или использованием сырья низкого качества.

Метод твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) с ГХ-МС/ПИД является мощным инструментом для регистрации и идентификации летучих веществ, характеризующих аромат пищевых масел и жиров. Одним из основных составляющих этого аромата являются летучие вторичные продукты окисления. Их идентификация и впоследствии количественное измерение может позволить проводить оценку рисков потребления пищевых масел, жиров и масложировых продуктов даже на ранних этапах окисления и, в целом, независимо от степени окисленности образца масла или жира в отличие от трудно интерпретируемых и спорных результатов определения перекисного и анизидинового чисел.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 2-МХПД – 2-монохлорпропандиол
2-МХПДЭ – эфиры 2-монохлорпропандиола с жирными кислотами
3-МБПД – 3-монобромпропандиол
3-МХПД – 3-монохлорпропандиол
3-МХПДЭ – эфиры 3-монохлорпропандиола с жирными кислотами
МАИР (IARC) – Международное агентство по изучению рака (International Agency for Research on Cancer)
М – маргарины
MRM – режим мониторинга выбранных реакций
PF – фракции пальмового масла
SF – подсолнечные масла
SIM – режим мониторинга выбранных ионов
БГТ – бутилгидрокситолуол
В – вымороженное (масло)
ГП – глицидил пальмитат
ГХ/МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
ГХ/МС-МС – газовый хроматограф с tandemным масс-спектрометрическим детектированием
ГХ/ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием
ГЭ – глицидиловые эфиры (с жирными кислотами)
Д – дезодорированное (масло)
Д/К/П – волокно дивинилбензол/карбоксен/полидиметилсилоксан
ЖКС – жирнокислотный состав
ЗМЖ (MFS) – заменитель молочного жира
ЗМК (CBA) – заменитель масла какао
К/П – волокно карбоксен/полидиметилсилоксан
Н – нерафинированное (масло)
О – отбеленное (масло)
П – волокно полиакрилат
П/Д – волокно полидиметилсилоксан/ дивинилбензол
ПМ (PO) - пальмовые масла
ПЧ – перекисное число
Р – рафинированное (масло)
РЖС (VFS) – растительно-жировой спред

РЦКП – ротатбельный центральный композиционный план

С – кондитерские жиры

СРС (VBS) – сливочно-растительный спред

ТФМЭ – твердофазная микроэкстракция

Ф – фильтрованное (масло)

ФБК – фенилборная кислота

ХО – холодный отжим

ЭЖП – эмульсионные жировые продукты

IQR – межквартильный размах (interquartile range)

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурункова Ю.Э, Успенская М.В., Самуйлова Е.О. Растительные масла: свойства, технологии получения и хранения, окислительная стабильность. Учебно-методическое пособие. Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2020. 82 с.
2. Главный государственный санитарный врач Российской Федерации. Постановление от 28 января 2021 года N 2 Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 1.2.3685-21 Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания [Электронный ресурс] 2021. 987 с. URL: <https://docs.cntd.ru/document/573500115> (дата обращения: 23.08.2021).
3. ГОСТ 31756-2012 (ISO 6885:2006) Жиры и масла животные и растительные. Определение анизидинового числа (с Поправками) от 29 ноября 2012 - docs.cntd.ru [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200101336> (дата обращения: 18.08.2021).
4. ГОСТ ИСО 18363-1:2020 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 переэтерификации и измерения содержания 3-МХПД и дифференциальное измерение содержания глицидола [Электронный ресурс]. 2020. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200177309> (дата обращения: 23.08.2021).
5. ГОСТ ИСО 18363-2:2020 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 переэтерификации и измерения содержания 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола [Электронный ресурс]. 2020. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200177310> (дата обращения: 23.08.2021).
6. ГОСТ ИСО 18363-3:2020 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 переэтерификации и измерение содержания 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола [Электронный ресурс]. 2020. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200177311> (дата обращения: 23.08.2021).
7. ГОСТ Р 51487-99 Масла растительные и жиры животные. Метод определения перекисного числа от 22 декабря 1999 - docs.cntd.ru [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200028330> (дата обращения: 18.08.2021).

8. 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 переэтерификации и измерение содержания 2-МХПД, 3-МХПД и глицидола от 18 декабря 2019 - docs.cntd.ru [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200170246> (дата обращения: 18.08.2021).

9. Евразийская Экономическая Комиссия. Решение “О внесении изменений в технический регламент Таможенного союза «Технический регламент на масложировую продукцию» (ТР ТС 024/2011)”. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.eurasiancommission.org/ru/act/tehnreg/deptexreg/tr/Documents/Изменения № 2 в ТР ТС 024-2011 на ВГС.pdf>.

10. Коллегия Евразийской экономической комиссии. Решение Коллегии ЕЭК № 132 от 06.08.2019 О внесении изменений в перечень товаров, для которых установлены единые санитарные требования (согласно кодам ТН ВЭД ЕАЭС), раздела 1 главы II Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к продуктам [Электронный ресурс]. 2019. С. 4. URL: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01422653/clcd_08082019_132.

11. Макаренко М.А. и др. Монохлорпропандиолы, глицидол и их эфиры в детском питании // Вопросы детской диетологии. 2019. Т. 17, № 1. С. 38–48.

12. Макаренко М.А. и др. Определение эфиров монохлорпропандиола и глицидиловых эфиров методом длительной щелочной переэтерификации с газовой хроматографией с тандемным масс-спектрометрическим детектированием в пищевых растительных маслах и масложировых продуктах // Вопросы питания. 2020. Т. 89, № 6. С. 113–122.

13. Макаренко М.А. и др. Применение волокон различной природы в анализе летучих соединений подсолнечного масла различной степени очистки методом хэдспейс-твердофазной микроэкстракции с ГХ/МС // Акт. Вопр. Нутр., Биотех. Безоп. Пищ: мат. всерос. науч. конф. с межд. уч., Москва, 12-13 октября 2017 г, 2017. С. 268–273.

14. Макаренко М.А. и др. Продукты вторичного окисления пищевых масел и жиров. Оценка рисков для здоровья человека (Сообщение 1) // Вопросы питания. 2018. Т. 87, № 6. С. 125–138.

15. Макаренко М.А., Малинкин А.Д Влияние количества дезодораций пищевого подсолнечного масла на содержание технологических контаминантов монохлорпропандиолов, глицидола и их эфиров // Осн. Здор. Пит. Пут. Проф. Алим.

Завис. Заболев.: сборник материалов. II школы молодых учёных, Москва, 23-25 октября 2019 г, 2019. С. 56-59.

16. 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. Т. 100, № 6. С. 640–646.

17. О'Брайен, Р. Жиры и масла. Производство, состав и свойства, применение. 2nd Под ред. / Под ред. Широкова В.Д. et al. Сб. : Профессия, 2007. 752 С.

18. Саркисян В.А., Кочеткова А.А., Бессонов В.В., Глазкова И.В. Токсикологическая характеристика основных продуктов окисления липидов // Вопросы питания. 2016. № 6. С. 80-85

19. Техника и технологии производства и переработки растительных масел: учебное пособие. / Под ред. Нагорнов С.А. et al. Тамбов: Изд-во ГОУВПОТГТУ, 2010. 96 с.

20. Технология производства растительных масел: учебник для вузов по спец. "Технология жиров" / Под ред. Копейковский В.М., Данильчук С.И., Гарбузова Г.И. и др. М. : Лег. и пищ. пром-сть, 1982. 415 с.

21. A process for refining glyceride oil comprising a basic ionic liquid treatment: patent WO2016189333A1 United States of America, PCT/GB2016/051566 / Goodrich P. et.al., filling date 27.05.2016; publication date 01.12.2016.

22. Aasa J, Törnqvist M, Abramsson-Zetterberg L. Measurement of micronuclei and internal dose in mice demonstrates that 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) has no genotoxic potency in vivo // Food Chem. Toxicol. 2017. Vol. 109. P. 414–420.

23. Aasa J. et al. Quantification of the mutagenic potency and repair of glycidol-induced DNA lesions // Mutat. Res. 2016. Vol. 805. P. 38–45.

24. Aasa J. et al. The genotoxic potency of glycidol established from micronucleus frequency and hemoglobin adduct levels in mice // Food Chem. Toxicol. 2017. Vol. 100. P. 168–174.

25. Abraham K. et al. Urinary Excretion of 2/3-Monochloropropanediol (2/3-MCPD) and 2,3-Dihydroxypropylmercapturic Acid (DHPMA) after a Single High dose of Fatty Acid Esters of 2/3-MCPD and Glycidol: A Controlled Exposure Study in Humans // Mol. Nutr. Food Res. 2021. Vol. 65, № 4. P. 2000735.

26. Abraham K., et al. Relative oral bioavailability of 3-MCPD from 3-MCPD fatty acid esters in rats // Arch. Toxicol. 2013. Vol. 87, № 4. P. 649–659.

27. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–129 [Электронный ресурс], 1965. Last updated: 2021-07-22 02.00pm (CEST). URL: <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>. (дата обращения 15.08.2021)
28. Ahern K.W. et al. Regioisomer-independent quantification of fatty acid oxidation products by HPLC-ESI-MS/MS analysis of sodium adducts // *Sci. Rep. Sci Rep*, 2019. Vol. 9, № 1. P. 11197.
29. Akane H. et al. Gene expression profile of brain regions reflecting aberrations in nervous system development targeting the process of neurite extension of rat offspring exposed developmentally to glycidol // *J. Appl. Toxicol.* 2014. Vol. 34, № 12. P. 1389–1399.
30. Akane H. et al. Glycidol induces axonopathy by adult-stage exposure and aberration of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by developmental exposure in rats // *Toxicol. Sci.* 2013. Vol. 134, № 1. P. 140–154.
31. Aladedunye, F. Toxic contaminants of thermo-oxidatively processed edible oils/fats // *Lipid Technol.* 2016. Vol. 28, № 7. P. 117–121.
32. Alberdi-Cedeño J., Ibargoitia M.L., Guillén M.D. Monitoring of minor compounds in corn oil oxidation by direct immersion-solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry. New oil oxidation markers // *Food Chem.* 2019. Vol. 290. P. 286–294.
33. Alberdi-Cedeño J., Ibargoitia M.L., Guillén M.D. Oxylipins Associated to Current Diseases Detected for the First Time in the Oxidation of Corn Oil as a Model System of Oils Rich in Omega-6 Polyunsaturated Groups. A Global, Broad and in-Depth Study by ¹H NMR Spectroscopy // *Antioxidants*. 2020. Vol. 9, № 6. P. 544.
34. Alexandri, E. et al. High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution // *Molecules*. 2017. Vol. 22, № 10. P. 1663.
35. Al-Marzoqi A., Hameed I., Idan S. Analysis of bioactive chemical components of two medicinal plants (*Coriandrum sativum* and *Melia azedarach*) leaves using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) // *African J. Biotechnol.* 2015. Vol. 14, № 40. P. 2812–2830.
36. Alshuiael S., Al-Ghouti M. Multivariate analysis for FTIR in understanding treatment of used cooking oil using activated carbon prepared from olive stone // *PLoS One*. 2020. Vol. 15, № 5.
37. Amarnath V., Amarnath K. Scavenging 4-Oxo-2-nonenal // *Chem. Res. Toxicol.* 2015. Vol. 28, № 10. P. 1888–1890.

38. Ambreen G., Siddiq A., Hussain K. Association of long-term consumption of repeatedly heated mix vegetable oils in different doses and hepatic toxicity through fat accumulation // *Lipids Health Dis.* 2020. Vol. 19, № 1. P. 9.
39. Andres S., Appel K., Lampen A. Toxicology, occurrence and risk characterisation of the chloropropanols in food: 2-monochloro-1,3-propanediol, 1,3-dichloro-2-propanol and 2,3-dichloro-1-propanol // *Food Chem. Toxicol.* 2013. Vol. 58. P. 467–478
40. Arisseto A.P. et al. 3-MCPD and glycidyl esters in infant formulas from the Brazilian market: Occurrence and risk assessment // *Food Control.* 2017. Vol. 77. P. 76–81.
41. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Volumes 1-6 (6th Edition) // *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* / ed. Shahidi F. John Wiley & Sons, 2005. 3616 p.
42. Bakhiya N. et al. Toxicological assessment of 3-chloropropane-1,2-diol and glycidol fatty acid esters in food // *Mol. Nutr. Food Res.* 2011. Vol. 55, № 4.
43. Barriuso B., Astiasarán I., Ansorena D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task // *Eur. Food Res. Technol.* 2012. Vol. 236, № 1. P. 1–15.
44. Bastaki M. et al. 2,4-Decadienal does not induce genotoxic effects in vivo micronucleus studies // *Mutat. Res. Mutat Res.* 2019. Vol. 846.
45. Bastide N.M. et al. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake // *Cancer Res. Cancer Res.* 2015. Vol. 75, № 5. P. 870–879.
46. Batool Z. et al. A review on furan: Formation, analysis, occurrence, carcinogenicity, genotoxicity and reduction methods // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2020. Vol. 61, № 3. P. 395–406.
47. Becalski A. et al. A pilot survey of 2- and 3-monochloropropanediol and glycidol fatty acid esters in foods on the Canadian market 2011–2013 // *J. Food Compos. Anal.* 2015. Vol. 37. P. 58–66.
48. Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. *Food chemistry. Lipids* (4th ed.) / ed. Akoh C.C. Taylor & Francis, 2017. 1015 p.
49. ben Hammouda I. et al. Comparison and characterization of volatile compounds as markers of oils stability during frying by HS–SPME–GC/MS and Chemometric analysis // *J. Chromatogr. B.* 2017. Vol. 1068–1069. P. 322–334.
50. Benigni R., Passerini L., Rodomonte A. Structure–activity relationships for the mutagenicity and carcinogenicity of simple and α - β unsaturated aldehydes // *Environ. Mol. Mutagen.* 2003. Vol. 42, № 3. P. 136–143.
51. Bingham E., Cofrancesco J., Powell C.H. *Patty's Toxicology, 6 Volume Set, 6th Edition* / ed. Bingham E., Cofrancesco J. John Wiley & Sons, 2012. 6200 p.

52. Bird R.P., Draper H.H., Valli V.E.O. Toxicological evaluation of malonaldehyde: A 12-month study of mice // *J. Toxicol. Environ. Health*. 2009. Vol. 10, № 6. P. 897–905.
53. Blair I. Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage // *Exp. Gerontol*. 2001. Vol. 36, № 9. P. 1473–1481.
54. Bocci F., Frega N. Analysis of the volatile fraction from sunflower oil extracted under pressure // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996. Vol. 73, № 6. P. 713–716.
55. Braeuning A. et al. Analysis of 3-MCPD- and 3-MCPD dipalmitate-induced proteomic changes in rat liver // *Food Chem. Toxicol.* 2015. Vol. 86. P. 374–384.
56. Breitzig M. et al. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2016. Vol. 311, № 4. P. C537–C543.
57. Brooks P., Zakhari S. Acetaldehyde and the genome: beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis // *Environ. Mol. Mutagen.* 2014. Vol. 55, № 2. P. 77–91.
58. Buhrke T. et al. 2-Chloro-1,3-propanediol (2-MCPD) and its fatty acid esters: cytotoxicity, metabolism, and transport by human intestinal Caco-2 cells // *Arch. Toxicol.* 2015. Vol. 89, № 12. P. 2243–2251.
59. Buhrke T. et al. Comparative analysis of transcriptomic responses to repeated-dose exposure to 2-MCPD and 3-MCPD in rat kidney, liver and testis // *Food Chem. Toxicol.* 2017. Vol. 106. P. 36–46.
60. Buhrke T., Weisshaar R., Lampen A. Absorption and metabolism of the food contaminant 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and its fatty acid esters by human intestinal Caco-2 cells // *Arch. Toxicol.* 2011. Vol. 85, № 10. P. 1201–1208.
61. Cao J. et al. Analysis of nonpolar lipophilic aldehydes/ketones in oxidized edible oils using HPLC-QqQ-MS for the evaluation of their parent fatty acids // *Food Res. Int.* 2014. Vol. 64. P. 901–907.
62. Cao J. et al. Oxidative stabilities of olive and camellia oils: Possible mechanism of aldehydes formation in oleic acid triglyceride at high temperature // *LWT*. 2020. Vol. 118. P. 108858.
63. Cebi N. et al. Prediction of peroxide value in omega-3 rich microalgae oil by ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometrics // *Food Chem.* 2017. Vol. 225. P. 188–196.
64. Chan P. et al. Forestomach tumor induction by 2,4-hexadienal in F344N rats and B6C3F1 mice // *Arch. Toxicol.* 2003. Vol. 77, № 9. P. 511–520.
65. Chan P. NTP toxicity studies of toxicity studies of 2,4-decadienal (CAS No. 25152-84-5) administered by gavage to F344/N Rats and B6C3F1 mice // *Toxicity report series*. 2011. № 76. 94 p.

66. Chang Y., Lin P. Trans, trans-2,4-decadienal induced cell proliferation via p27 pathway in human bronchial epithelial cells // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008. Vol. 228, № 1. P. 76–83.
67. Chemical food safety - BfR [Электронный ресурс]. URL: https://www.bfr.bund.de/en/presseinformation/2011/A/chemical_food_safety-59770.html (дата обращения: 19.08.2021).
68. Cho W. et al. Subchronic toxicity study of 3-monochloropropane-1,2-diol administered by drinking water to B6C3F1 mice // *Food Chem. Toxicol.* 2008. Vol. 46, № 5. P. 1666–1673.
69. Cho W.S. et al. Carcinogenicity study of 3-monochloropropane-1,2-diol in Sprague–Dawley rats // *Food Chem. Toxicol.* 2008. Vol. 46, № 9. P. 3172–3177.
70. Claxson A. et al. Generation of lipid peroxidation products in culinary oils and fats during episodes of thermal stressing: a high field 1H NMR study // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 355, № 1. P. 81–90.
71. Commission regulation (EU) 2018/ 290 - of 26 February 2018 - amending Regulation (EC) No 1881/ 2006 as regards maximum levels of glycidyl fatty acid esters in vegetable oils and fats, infant formula, follow-on formula and foods for special medical purpose [Электронный ресурс]. 2018. URL: <http://www.fao.org/3/a-bq821e.pdf> (дата обращения: 19.08.2021).
72. Commission Regulation (EU) 2020/1322 -of 23 September 2020 - amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of 3-monochloropropanediol (3-MCPD), 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in certain foods (Text with EEA relevance) [Электронный ресурс]. 2020. URL: <http://data.europa.eu/eli/reg/2020/1322/oj> (дата обращения: 19.08.2021).
73. Committee on Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Annual report: 3-Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) [Электронный ресурс]. 2000. 102–147 p. URL: [moz-extension://c70b4efe-907b-40f4-a32b-0e0637fd087d/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fcot.food.gov.uk%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Fcot%2Fcotcomsocrep_soc.pdf](https://www.food.gov.uk/sites/default/files/2000/02/3MCPD%20annual%20report%202000.pdf) (дата обращения: 18.08.2021).
74. Cordella C.B.Y. et al. A multiway chemometric and kinetic study for evaluating the thermal stability of edible oils by 1H NMR analysis: Comparison of methods // *Talanta.* 2012. Vol. 88. P. 358–368.
75. Crawford D.L. et al. Acute toxicity of malonaldehyde // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1965. Vol. 7, № 6. P. 826–832.

76. Crews C. 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*. 2013. Vol. 30, № 1. P. 11–45.
77. Custodio-Mendoza J.A. et al. Analysis of free malondialdehyde in edible oils using gas-diffusion microextraction // *J. Food Compos. Anal.* 2019. Vol. 82. P. 103254.
78. Custodio-Mendoza J.A. et al. Determination of malondialdehyde, acrolein and four other products of lipid peroxidation in edible oils by Gas-Diffusion Microextraction combined with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction // *J. Chromatogr. A*. 2020. Vol. 1627. P. 461397.
79. CXS210-1999 Standard for named vegetable oils [Электронный ресурс], Amended in 2019. 1999. URL: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B210-1999%252FCXS_210e.pdf (дата обращения: 23.08.2021).
80. CXS211-1999 Standard for named animal fats [Электронный ресурс], Amended in 2019. 1999. URL: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B211-1999%252FCXS_211e.pdf (дата обращения: 23.08.2021).
81. CXS325R-2017 Regional standard for unrefined shea butter [Электронный ресурс], amended in 2020. 2017. URL: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B325R-2017%252FCXS_325Re.pdf (дата обращения: 18.08.2021).
82. CXS329-2017 Standard for fish oil [Электронный ресурс], 2017. URL: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B329-2017%252FCXS_329e.pdf (дата обращения: 23.08.2021).
83. Damerau A. et al. Evaluation of the composition and oxidative status of omega-3 fatty acid supplements on the Finnish market using NMR and SPME-GC–MS in comparison with conventional methods // *Food Chem.* 2020. Vol. 330. P. 127194.
84. *Dangerous Properties of Industrial Materials*. 11th Edition. / ed. Lewis R.J.S. NJ: Wiley-Interscience, Wiley & Sons, 2004. 1869 p.
85. Dantas L. et al. Lipid aldehyde hydrophobicity affects apo-SOD1 modification and aggregation // *Free Radic. Biol. Med.* 2020. Vol. 156. P. 157–167
86. Demir E. et al. Genotoxic analysis of four lipid-peroxidation products in the mouse lymphoma assay // *Mutat. Res.* 2011. Vol. 726, № 2. P. 98–103

87. Demir E. et al. Mutagenic/recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila* // *Food Chem. Toxicol.* 2013. Vol. 53. P. 221–227.
88. Demir E., Marcos R. Assessing the genotoxic effects of two lipid peroxidation products (4-oxo-2-nonenal and 4-hydroxy-hexenal) in haemocytes and midgut cells of *Drosophila melanogaster* larvae // *Food Chem. Toxicol.* 2017. Vol. 105. P. 7
89. Destailats F. et al. Glycidyl esters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Part I: Formation mechanism // *Food Chem.* 2012. Vol. 131, № 4. P. 1391–1398.
90. Dong H. et al. Toxicogenomic assessment of liver responses following subchronic exposure to furan in Fischer F344 rats // *Arch. Toxicol.* 2015. Vol. 90, № 6. P. 1351–1367.
91. Douny C. et al. Validation of the Analytical Procedure for the Determination of Malondialdehyde and Three Other Aldehydes in Vegetable Oil Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and Application to Linseed Oil // *Food Anal. Methods.* 2014. Vol. 8, № 6. P. 1425–1435.
92. Eckl P.M., Ortner A., Esterbauer H. Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 1993. Vol. 290, № 2. P. 183–192.
93. Eder E. et al. Mutagenicity of β -alkyl substituted acrolein congeners in the *Salmonella typhimurium* strain TA100 and genotoxicity testing in the SOS chromotest // *Environ. Mol. Mutagen.* 1992. Vol. 19, № 4. P. 338–345.
94. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) et al. Update of the risk assessment on 3-monochloropropane diol and its fatty acid esters // *EFSA J.* 2018. Vol. 16, № 1. P. 48.
95. EFSA EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF) et al. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 13 Revision 3 (FGE.13Rev3): furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents and heteroatoms from chemical group 14 // *EFSA J.* 2021. Vol. 19, № 2. P. 61.
96. Egle J.L., Gochberg B.J. Respiratory retention and acute toxicity of furan // *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 2010. Vol. 40, № 4. P. 310–314.
97. Elmore J.S., Nisyrios I., Mottram D.S. Analysis of the headspace aroma compounds of walnuts (*Juglans regia* L.) // *Flavour Fragr. J.* 2005. Vol. 20, № 5. P. 501–506.
98. Ermacora A., Hrnčirik K. Evaluation of an Improved Indirect Method for the Analysis of 3-MCPD Esters Based on Acid Transesterification // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2012. Vol. 89, № 2. P. 211–217.
99. European Food Safety Authority. 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 Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) // EFSA J. 2016. Vol. 14, № 5. P. 4426.

100. Ewert A., Granvogel M., Schieberle P. Isotope-Labeling Studies on the Formation Pathway of Acrolein during Heat Processing of Oils // J. Agric. Food Chem. 2014. Vol. 62, № 33. P. 8524–8529

101. FAO/WHO. Summary report of the eighty-third meeting of JECFA. 3-MCPD esters // Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, 2016. P. 16.

102. Feng Z., Hu W., Tang M. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: A possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. National Academy of Sciences, 2004. Vol. 101, № 23. P. 8598–8602.

103. Food Safety Commission of Japan (FSCJ). Considerations on glycidol and its fatty acid esters in foods [Электронный ресурс] // Risk assessment report – Novel Foods and Food Additives FS/185/2015, 2015. URL: http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/others/annex_glycidol_26-52.pdf (дата обращения: 19.08.2021).

104. Frankel E.N. Lipid Oxidation: Second Edition. 2nd ed. Elsevier Inc., 2005. 488 p.

105. Frenzel F. et al. Proteomic analysis of 2-monochloropropanediol (2-MCPD) and 2-MCPD dipalmitate toxicity in rat kidney and liver in a 28-days study // Food Chem. Toxicol. Pergamon, 2018. Vol. 121. P. 1–10.

106. Frenzel F. et al. Proteomic effects of repeated-dose oral exposure to 2-monochloropropanediol and its dipalmitate in rat testes // Food Chem. Toxicol. 2018. Vol. 116. P. 354–359.

107. Fukushima, A. et al. Cardiovascular effects of leukotoxin (9,10-epoxy-12-octadecenoate) and free fatty acids in dogs // Cardiovasc. Res. 1988. Vol. 22, № 3. P. 213–218.

108. Gasparovic A.C. et al. Cancer growth regulation by 4-hydroxynonenal // Free Radic. Biol. Med. Pergamon, 2017. Vol. 111. P. 226–234.

109. Gassenmeier K., Schieberle P. Formation of the intense flavor compound trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal in thermally treated fats // J. Am. Oil Chem. Soc. 1994. Vol. 71, № 12. P. 1315–1319

110. Gaunt I. et al. Acute and short-term toxicity studies on trans-2-hexenal // Food Cosmet. Toxicol. 1971. Vol. 9, № 6. P. 775–786.

111. Gęgotek A., Skrzydlewska E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products // Chem. Phys. Lipids. 2019. Vol. 221. P. 46–52.

112. Gentile F. et al. DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity // AIMS Genet. 2017. Vol. 4, № 2. P. 103.

113. Ghiasvand A., Behfar M., Yazdankhah F. Reduced-Pressure Fiber-in-Needle Sampling of Aldehydes for Room Temperature Assessment of Edible Oils' Oxidative Stability // *Chromatogr.* 2019 829. Springer, 2019. Vol. 82, № 9. P. 1405–1414.
114. Ghorbani S.G. et al. Comprehensive profiling of lipid oxidation volatile compounds during storage of mayonnaise // *J. Food Sci. Technol.* 2019. Vol. 56, № 9. P. 4076.
115. Godswill A.C. et al. Effects of repeated deep frying on refractive index and peroxide value of selected vegetable oils // *Int. J. Adv. Acad. Res. | Sci. Technol. Eng.* 2018. Vol. 4, № 4. P. 106–119.
116. Goicoechea E. et al. Fate in digestion in vitro of several food components, including some toxic compounds coming from omega-3 and omega-6 lipids // *Food Chem. Toxicol.* 2011. Vol. 49, № 1. P. 115–124.
117. Golay P.-A., Dong Y. Determination of Labeled Fatty Acids Content in Milk Products, Infant Formula, and Adult/Pediatric Nutritional Formula by Capillary Gas Chromatography: Single-Laboratory Validation, First Action 2012.13 // *J. AOAC Int.* 2015. Vol. 98, № 6. P. 1679–1696.
118. Golzer P. et al. (E)-2-Hexenal-Induced DNA Damage and Formation of Cyclic 1,N2-(1,3-Propano)-2'-deoxyguanosine Adducts in Mammalian Cells // *Chem. Res. Toxicol.* 1996. Vol. 9, № 7. P. 1207–1213.
119. Grzelińska E. et al. A Spin-label Study of the Effect of Gamma Radiation on Erythrocyte Membrane. Influence of Lipid Peroxidation on Membrane Structure // *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Physics, Chem. Med.* 2009. Vol. 36, № 4. P. 325–334.
120. Guillén M.D. et al. Study of both Sunflower Oil and Its Headspace throughout the Oxidation Process. Occurrence in the Headspace of Toxic Oxygenated Aldehydes // *J. Agric. Food Chem.* 2005. Vol. 53, № 4. P. 1093–1101.
121. Guillén M.D., Cabo N. Usefulness of the Frequency Data of the Fourier Transform Infrared Spectra To Evaluate the Degree of Oxidation of Edible Oils // *J. Agric. Food Chem.* 1999. Vol. 47, № 2. P. 709–719.
122. Guillén M.D., Goicoechea E. Detection of Primary and Secondary Oxidation Products by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in Sunflower Oil during Storage // *J. Agric. Food Chem.* 2007. Vol. 55, № 26. P. 10729–10736.
123. Guillén M.D., Goicoechea E. Formation of oxygenated α,β -unsaturated aldehydes and other toxic compounds in sunflower oil oxidation at room temperature in closed receptacles // *Food Chem.* 2008. Vol. 111, № 1. P. 157–164.

124. Guillén M.D., Goicoechea E. Toxic Oxygenated α,β -Unsaturated Aldehydes and their Study in Foods: A Review // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008. Vol. 48, № 2. P. 119–136.
125. Guillén M.D., Uriarte P.S. Study by ^1H NMR spectroscopy of the evolution of extra virgin olive oil composition submitted to frying temperature in an industrial fryer for a prolonged period of time // *Food Chem.* 2012. Vol. 134, № 1. P. 162–172.
126. Haiyan Z. et al. Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils // *Food Chem.* 2007. Vol. 4, № 100. P. 1544–1551.
127. Hamlet C., Sadd P. Kinetics of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) degradation in high temperature model systems // *Eur. Food Res. Technol.* 2002. Vol. 215, № 1. P. 46–50.
128. Hammond A., Garle M., Fry J. Toxicity of dichloropropanols in rat hepatocyte cultures // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1996. Vol. 1, № 1. P. 39–43.
129. Harris E. Improving lipid oxidation measurements: investigating a ^1H NMR alternative to and evaluating the assumptions of standard chemical methods: dissertation submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science [Электронный ресурс]. Dalhousie University Halifax, Nova Scotia March, 2017. 82 p. URI: <http://hdl.handle.net/10222/72820> (дата обращения: 19.08.2021).
130. Hatai M. et al. trans-2-Pentenal, an Active Compound in Cigarette Smoke, Identified via Its Ability to Form Adducts with Glutathione // *Chem. Pharm. Bull.* 2019. Vol. 67, № 9. P. 1000–1005.
131. Hayakawa K., Linko Y.Y., Linko P. The role of trans fatty acids in human nutrition // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000. Vol. 102. P. 419–425.
132. Haywood R.M. et al. Detection of Aldehydes and Their Conjugated Hydroperoxydiene Precursors in Thermally-Stressed Culinary Oils and Fats: Investigations Using High Resolution Proton Nmr Spectroscopy // *Free Radic. Res.* 2009. Vol. 22, № 5. P. 441–482.
133. Hills G.L., Thiel C.C. The ferric thiocyanate method of estimating peroxide in the fat of butter, milk and dried milk // *J. Dairy Res.* 1946. Vol. 14, № 3. P. 340–353
134. Hori K., Koh F.H., Tsumura K. A metabolomics approach using LC TOF-MS to evaluate oxidation levels of edible oils // *Food Anal. Methods.* 2019. Vol. 12, № 8. P. 1799–1804
135. Hornero-Méndez D., Pérez-Gálvez A., Mínguez-Mosquera M.I. A rapid spectrophotometric method for the determination of peroxide value in food lipids with high carotenoid content // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2001. Vol. 78, № 11. P. 1151–1155.
136. Hosseini H. et al. A Review on Frying: Procedure, Fat, Deterioration Progress and Health Hazards // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2016. Vol. 93, № 4. P. 445–466.
137. Hrnčirik K. Indirect methods for the Analysis of MCPD and Glycidyl Esters: A Critical Overview: presentation on ILSI Europe workshop on MCPD and glycidyl esters in food

products, 9-10 November 2011, Brussels, Belgium, [Электронный ресурс], 2011. URL: https://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/06/Hrncirik_ILSI-2011_3MCPD-for-distribution-2-1.pdf (дата обращения 18.08.2021)

138. Hrncirik K., Duijn G. van. An initial study on the formation of 3-MCPD esters during oil refining // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011. Vol. 113, № 3. P. 374–379.

139. Hu G. et al. An efficient method for the simultaneous determination of furan, 2-methylfuran and 2-pentylfuran in fruit juices by headspace solid phase microextraction and gas chromatography–flame ionisation detector // *Food Chem.* 2016. Vol. 192. P. 9–14.

140. Hu Y. et al. trans,trans-2,4-Decadienal induces endothelial cell injury by impairing mitochondrial function and autophagic flux // *Food Funct.* 2021. Vol. 12, № 12. P. 5488–5500.

141. Hu, Y. et al. Trans, trans-2,4-decadienal impairs vascular endothelial function by inducing oxidative/nitrative stress and apoptosis // *Redox Biol.* 2020. Vol. 34. P. 101577.

142. Huang G. et al. Necroptosis in 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD)-dipalmitate-induced acute kidney injury in vivo and its repression by miR-223-3p // *Toxicology.* 2018. Vol. 406–407. P. 33–43.

143. Huo J. et al. 2-Methylfuran: Toxicity and genotoxicity in male Sprague-Dawley rats // *Mutat. Res.* 2020. Vol. 854–855. P. 503209.

144. Hwang H.-S. 1 H NMR Spectroscopy for Assessment of Lipid Oxidation Due // *Advances in NMR Spectroscopy for Lipid Oxidation Assessment.* Springer, Cham, 2017. P. 15–31.

145. Hwang H.-S., Winkler-Moser J.K., Liu S.X. Reliability of 1H NMR Analysis for Assessment of Lipid Oxidation at Frying Temperatures // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2017. Vol. 94, № 2. P. 257–270.

146. Hwang M. et al. Toxicity value for 3-monochloropropane-1,2-diol using a benchmark dose methodology // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2009. Vol. 53, № 2. P. 102–106

147. Ikeda N. et al. Genotoxicity studies of glycidol fatty acid ester (glycidol linoleate) and glycidol // *Food Chem. Toxicol.* 2012. Vol. 50, № 11. P. 3927–3933.

148. Inagaki R. et al. Investigation of DNA damage of glycidol and glycidol fatty acid esters using Fpg-modified comet assay // *Fundam. Toxicol. Sci.* 2019. Vol. 6, № 1. P. 9–14.

149. Irwin J.W., Hedges N., Measuring lipid oxidation // *Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food.* 1 st ed. Edited by: R. Steele. Woodhead Publishing, 2004. 448 p.

150. Islam B.U. et al. Genotoxicity and immunogenicity of crotonaldehyde modified human DNA // *Int. J. Biol. Macromol.* 2014. Vol. 65. P. 471–478.

151. ISO 18363-4:2021 Animal and vegetable fats and oils — Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS — Part 4: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol by GC-MS/MS [Электронный ресурс]. 2021. URL: <https://www.iso.org/standard/77363.html> (дата обращения: 23.08.2021).
152. Ito J. et al. A novel chiral stationary phase LC-MS/MS method to evaluate oxidation mechanisms of edible oils // *Sci. Reports* 2017 71. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–10.
153. Ito J. et al. Evaluation of lipid oxidation mechanisms in beverages and cosmetics via analysis of lipid hydroperoxide isomers // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 1–13.
154. Ivanova-Petropulos V. et al. Characterisation of traditional Macedonian edible oils by their fatty acid composition and their volatile compounds // *Food Res. Int.* 2015. Vol. 77, № 3. P. 506–514.
155. Frolova Y. et al. The Influence of Edible Oils ' Composition on the Properties of Beeswax-Based Oleogels // *Gels*. 2022. № 1 (8). 17 P.
156. Janssen H.-G. et al. A Fast GC-MS-Based Method for Efficacy Assessment of Natural Anti-Oxidants for Inhibiting Lipid Oxidation // *J. AOAC Int.* 2021. Vol. 104, № 2. P. 260–266.
157. Janzowski C. et al. α,β -Unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells // *Mutagenesis*. 2003. Vol. 18, № 5. P. 465–470.
158. Jhuo S.-J. et al. Effects of Trans, Trans-2,4-decadienal on the Ions Currents of Cardiomyocytes: Possible Mechanisms of Arrhythmogenesis Induced by Cooking-oil Fumes // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–6.
159. Ji J. et al. Pathway of 3-MCPD-induced apoptosis in human embryonic kidney cells // *J. Toxicol. Sci.* 2017. Vol. 42, № 1. P. 43–52.
160. Jiang Y. et al. Quantitative determination of peroxide value of edible oil by algorithm-assisted liquid interfacial surface enhanced Raman spectroscopy // *Food Chem.* 2021. Vol. 344. P. 128709.
161. Jia-ning H. et al. Neutrophil-derived epoxide, 9,10-epoxy-12-octadecenoate, induces pulmonary edema // *Lung* 1988 1661. 1988. Vol. 166, № 1. P. 327–337.
162. Kanazawa K., Ashida H. Catabolic fate of dietary trilinoleoylglycerol hydroperoxides in rat gastrointestinal // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1393, № 2–3. P. 336–348.

163. Kaneko T. et al. Lethal effects of a linoleic acid hydroperoxide and its autoxidation products, unsaturated aliphatic aldehydes, on human diploid fibroblasts // *Chem. Biol. Interact.* 1987. Vol. 63, № 2. P. 127–137.
164. Kato S. et al. Defensive effects of fullerene-C60 dissolved in squalane against the 2,4-nonadienal-induced cell injury in human skin keratinocytes HaCaT and wrinkle formation in 3D-human skin tissue model // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2010. Vol. 6, № 1. P. 52–58.
165. Kato S. et al. Determination of triacylglycerol oxidation mechanisms in canola oil using liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *npj Sci. Food.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 2, № 1. P. 1–11.
166. Kawai Y., Nuka E. Abundance of DNA adducts of 4-oxo-2-alkenals, lipid peroxidation-derived highly reactive genotoxins/ // *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2018. Vol. 62, № 1. P. 3–10.
167. Kettlitz B. et al. Furan and Methylfurans in Foods: An Update on Occurrence, Mitigation, and Risk Assessment // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019. Vol. 18, № 3. P. 738–752.
168. Kishikawa N., El-Maghrabey M.H., Kuroda N. Chromatographic methods and sample pretreatment techniques for aldehydes determination in biological, food, and environmental samples // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. Vol. 175. P. 112782.
169. Kiwamoto R., Rietjens I.M.C.M., Punt A. A Physiologically Based in Silico Model for trans-2-Hexenal Detoxification and DNA Adduct Formation in Rat // *Chem. Res. Toxicol.* 2012. Vol. 25, № 12. P. 2630–2641.
170. Klaassen C.D. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 9th Edition. / ed. Klaassen C.D. McGraw-Hill Education, 1990. 1331 p.
171. Kuhlmann J. Analysis and occurrence of dichloropropanol fatty acid esters and related process-induced contaminants in edible oils and fats // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2016. Vol. 118, № 3. P. 382–395.
172. Kuhlmann J. Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011. Vol. 113, № 3. P. 335–344.
173. Kuiper H.C. et al. Vitamin C supplementation lowers urinary levels of 4-hydroperoxy-2-nonenal metabolites in humans // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol. 50, № 7. P. 848–853.
174. Lee B.Q., Khor S.M. 3-Chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in Soy Sauce: A Review on the Formation, Reduction, and Detection of This Potential Carcinogen // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2015. Vol. 14, № 1. P. 48–66.

175. Lee H.S. et al. 3-MCPD (3-monochloro-1,2-propanediol) inhibit myogenic differentiation in murine skeletal myoblasts // *Chem. Biol. Interact.* 2021. Vol. 336. P. 109311.
176. Lee S.H., Oe T., Blair I.A. 4,5-Epoxy-2(E)-decenal-Induced Formation of 1,N6-Etheno-2'-deoxyadenosine and 1,N2-Etheno-2'-deoxyguanosine Adducts // *Chem. Res. Toxicol.* 2002. Vol. 15, № 3. P. 300–304.
177. Lee S.H., Oe T., Blair I.A. Vitamin C-Induced Decomposition of Lipid Hydroperoxides to Endogenous Genotoxins // *Science (80-.)*. 2001. Vol. 292, № 5524. P. 2083–2086.
178. Leigh J., MacMahon S. Occurrence of 3-monochloropropanediol esters and glycidyl esters in commercial infant formulas in the United States // *Food Addit. Contam. Part A*. 2017. Vol. 34, № 3. P. 356–370.
179. Li Q. et al. Application of Fourier transform infrared spectroscopy for the quality and safety analysis of fats and oils: A review // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018. Vol. 59, № 22. P. 3597–3611.
180. Li-Chan E., Chalmers J., Griffiths P. *Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science*. John Wiley & Sons, 2011. 872 p.
181. Lin P. et al. Metabolomic profiling of mice urine and serum associated with trans-trans 2, 4-decadienal induced lung lesions by liquid chromatography-mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. Vol. 406, № 17. P. 4287–4297.
182. Liu M. et al. Acute oral toxicity of 3-MCPD mono- and di-palmitic esters in Swiss mice and their cytotoxicity in NRK-52E rat kidney cells // *Food Chem. Toxicol.* 2012. Vol. 50, № 10. P. 3785–3791.
183. Liu P.W. et al. 3-MCPD and glycidol coexposure induces systemic toxicity and synergistic nephrotoxicity via NLRP3 inflammasome activation, necroptosis, and autophagic cell death // *J. Hazard. Mater.* 2021. Vol. 405. P. 124241.
184. Liu X. et al. Changes in Volatile Compounds of Peanut Oil during the Roasting Process for Production of Aromatic Roasted Peanut Oil // *J. Food Sci.* 2011. Vol. 76, № 3. P. C404–C412.
185. Liu Y. et al. Epoxy Stearic Acid, an Oxidative Product Derived from Oleic Acid, Induces Cytotoxicity, Oxidative Stress, and Apoptosis in HepG2 Cells // *J. Agric. Food Chem.* 2018. Vol. 66, № 20. P. 5237–5246
186. Liu Z.Y. et al. Effects of temperature and heating time on the formation of aldehydes during the frying process of clam assessed by an HPLC-MS/MS method // *Food Chem.* 2020. Vol. 308. P. 125650

187. Lokumana C. R. Collection and analysis of volatiles of various cultivated sunflower, *Helianthus Annuus*, (Asteraceae) germplasm and investigation of some aspects of host selection in adult red sunflower seed weevil, *Smicronyx Fulvus L.*, (Coleoptera: Curculionidae): A Thesis Submitted to the Graduate Faculty In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science [Электронный ресурс]. North Dakota State University of Agriculture and Applied Science, Fargo, North Dakota, 2017. 110 p. URL: [https://library.ndsu.edu/ir/bitstream/handle/10365/28644/Collection%20and%20Analysis%20of%20Volatiles%20of%20Various%20Cultivated%20Sunflower,%20Helianthus%20Annuus,%20\(Asteraceae\)%20Germplasm%20and%20Investigation%20of%20Some%20Aspects%20of%20Host%20Sele.pdf?sequence=1](https://library.ndsu.edu/ir/bitstream/handle/10365/28644/Collection%20and%20Analysis%20of%20Volatiles%20of%20Various%20Cultivated%20Sunflower,%20Helianthus%20Annuus,%20(Asteraceae)%20Germplasm%20and%20Investigation%20of%20Some%20Aspects%20of%20Host%20Sele.pdf?sequence=1) (дата обращения: 19.08.2021).
188. Lu J. et al. 3-Chloro-1, 2-propanediol inhibits autophagic flux by impairment of lysosomal function in HepG2 cells // *Food Chem. Toxicol.* 2020. Vol. 144. P. 111575
189. Ma L. et al. The effect of heating on the formation of 4-hydroxy-2-hexenal and 4-hydroxy-2-nonenal in unsaturated vegetable oils: Evaluation of oxidation indicators // *Food Chem.* 2020. Vol. 321. P. 126603
190. Ma L., Liu G. Simultaneous Analysis of Malondialdehyde, 4-Hydroxy-2-hexenal, and 4-Hydroxy-2-nonenal in Vegetable Oil by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography // *J. Agric. Food Chem.* 2017. Vol. 65, № 51. P. 11320–11328
191. Ma L., Liu G., Liu X. Amounts of malondialdehyde do not accurately represent the real oxidative level of all vegetable oils: a kinetic study of malondialdehyde formation // *Int. J. Food Sci. Technol.* 2019. Vol. 54, № 2. P. 412–423
192. Ma L., Liu G., Liu X. Malondialdehyde, 4-Hydroxy-2-Hexenal, and 4-Hydroxy-2-Nonenal in Vegetable Oils: Formation Kinetics and Application as Oxidation Indicators // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2019. Vol. 121, № 7. P. 1900040
193. Markaverich B. M. и др. Leukotoxin diols from ground corncob bedding disrupt estrous cyclicity in rats and stimulate MCF-7 breast cancer cell proliferation // *Environ. Health Perspect.* 2005. T. 113. № 12. C. 1698–1704.
194. Martelli A. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of five n-alkanals in primary cultures of rat and human hepatocytes // *Mutat. Res. Lett.* 1994. Vol. 323, № 3. P. 121–126
195. Martín E.S. et al. Solvent-based strategy improves the direct determination of key parameters in edible fats and oils by ¹H NMR // *J. Sci. Food Agric.* 2020. Vol. 100, № 4. P. 1726–1734.
196. Martínez-Yusta A., Goicoechea E., Guillén M.D. A Review of Thermo-Oxidative Degradation of Food Lipids Studied by ¹H NMR Spectroscopy: Influence of Degradative

Conditions and Food Lipid Nature // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2014. Vol. 13, № 5. P. 838–859.

197. Martínez-Yusta A., Guillén M.D. Deep-frying food in extra virgin olive oil: A study by ¹H nuclear magnetic resonance of the influence of food nature on the evolving composition of the frying medium // *Food Chem.* 2014. Vol. 150. P. 429–437

198. Martín-Rubio A.S., Sopelana P., Guillén M.D. Assessment of Soybean Oil Oxidative Stability from Rapid Analysis of its Minor Component Profile // *Molecules.* 2020. Vol. 25, № 20. P. 4860

199. Mascrez S., Psillakis E., Purcaro G. A multifaceted investigation on the effect of vacuum on the headspace solid-phase microextraction of extra-virgin olive oil // *Anal. Chim. Acta.* 2020. Vol. 1103. P. 106–114.

200. Matthäus B., Pudel F. Mitigation of MCPD and Glycidyl Esters in Edible Oils // *Processing Contaminants in Edible Oils: MCPD and Glycidyl Esters.* 2014. P. 23–55

201. Matysik S. et al. Metabolomics of fecal samples: A practical consideration // *Trends Food Sci. Technol.* 2016. Vol. 57. P. 244–255.

202. May-Zhang L.S. et al. Modified sites and functional consequences of 4-oxo-2-nonenal adducts in HDL that are elevated in familial hypercholesterolemia // *J. Biol. Chem.* 2019. Vol. 294, № 50. P. 19022–19033.

203. Medeiros M.H.G. DNA Damage by Endogenous and Exogenous Aldehydes // *J. Braz. Chem. Soc.* 2019. Vol. 30, № 10. P. 2000–2009.

204. Merás I.D. et al. Optimization of the thiobarbituric acid-malonaldehyde reaction in non-aqueous medium. Direct analysis of malonaldehyde in oil samples by HPLC with fluorimetric detection // *Microchem. J.* 2020. Vol. 159. P. 105318.

205. Merx D. et al. Rapid Quantitative Profiling of Lipid Oxidation Products in a Food Emulsion by ¹H NMR // *Anal. Chem.* 2018. Vol. 90, № 7. P. 4863–4870.

206. Monteiro M. et al. Analysis of volatile human urinary metabolome by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry for biomarker discovery: Application in a pilot study to discriminate patients with renal cell carcinoma // *Eur. J. Cancer.* 2014. Vol. 50, № 11. P. 1993–2002.

207. Morales A. et al. Evaporative light scattering detector in normal-phase high-performance liquid chromatography determination of FAME oxidation products // *J. Chromatogr. A.* 2012. Vol. 1254. P. 62–70.

208. Morales A. et al. Formation of oxidation products in edible vegetable oils analyzed as FAME derivatives by HPLC-UV-ELSD // *Food Res. Int.* 2014. Vol. 62. P. 1080–1086.

209. Moran E.J., Easterday O.D., Boser B.L. Acute oral toxicity of Selected Flavour Chemicals // *Drug Chem. Toxicol.* 2011. Vol. 3, № 3. P. 249–258.
210. Moselhy H.F. et al. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC // *J. Lipid Res.* 2013. Vol. 54, № 3. P. 852–858.
211. Mossoba M.E. et al. In vitro toxicological assessment of free 3-MCPD and select 3-MCPD esters on human proximal tubule HK-2 cells // *Cell Biol. Toxicol.* 2019. Vol. 36, № 3. P. 209–221.
212. Mossoba M.E. et al. Long-term in vitro effects of exposing the human HK-2 proximal tubule cell line to 3-monochloropropane-1,2-diol // *J. Toxicol. Sci.* 2020. Vol. 45, № 1. P. 45–56.
213. Moumtaz S. et al. Toxic aldehyde generation in and food uptake from culinary oils during frying practices: peroxidative resistance of a monounsaturate-rich algae oil // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 1–21.
214. Mubiru E. et al. Improved gas chromatography-flame ionization detector analytical method for the analysis of epoxy fatty acids // *J. Chromatogr. A.* 2013. Vol. 1318. P. 217–225.
215. Muik B. et al. Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy // *Anal. Chim. Acta.* 2007. Vol. 593, № 1. P. 54–67
216. Narayanankutty A. et al. Deep fried edible oils disturb hepatic redox equilibrium and heightens lipotoxicity and hepatosteatosis in male Wistar rats // *Hum. Exp. Toxicol.* 2016. Vol. 36, № 9. P. 919–930
217. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: 4-Hydroxynonenal (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5283344#section=Acute-Effects> (дата обращения 15.08.2021)
218. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: Crotonaldehyde (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447466#section=Acute-Effects> (дата обращения 15.08.2021)
219. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: Acetaldehyde (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/177#section=Acute-Effects> (дата обращения 15.08.2021)

220. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: Propionaldehyde (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/527#section=Acute-Effects> (дата обращения 15.08.2021)

221. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: Pentanal (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8063#section=Acute-Effects> (дата обращения 17.08.2021)

222. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: Malonaldehyde (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10964#section=Acute-Effects> (дата обращения 17.08.2021)

223. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: Glyoxal (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7860#section=Acute-Effects> (дата обращения 17.08.2021)

224. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: Acrolein (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7847#section=Acute-Effects> (дата обращения 17.08.2021)

225. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: 2-Pentenal (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5364752#section=Toxicity> (дата обращения 17.08.2021)

226. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: 2-Hexenal (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281168#section=Acute-Effects> (дата обращения 17.08.2021)

227. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: 2-Heptenal (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5283316#section=Acute-Effects> (дата обращения 17.08.2021)

228. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: 2-Decenal (compound) [Электронный ресурс].

URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5283345#section=Acute-Effects> (дата обращения 17.08.2021)

229. National Library of Medicine. PubChem: an open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Search: 4-Hydroxyhexenal (compound) [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5283314#section=Acute-Effects> (дата обращения 23.08.2021)

230. Nazari F. et al. Toxicological assessment of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) as a main contaminant of foodstuff in three different in vitro models: Involvement of oxidative stress and cell death signaling pathway // *J. Food Sci.* 2020. Vol. 85, № 11. P. 4061–4069.

231. Naziri E., Mitić M.N., Tsimidou M.Z. Contribution of tocopherols and squalene to the oxidative stability of cold-pressed pumpkin seed oil (*Cucurbita pepo* L.) // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2016. Vol. 118, № 6. P. 898–905.

232. Neff W.E. et al. Photosensitized oxidation of methyl linoleate monohydroperoxides: Hydroperoxy cyclic peroxides, dihydroperoxides, keto esters and volatile thermal decomposition products // *Lipids.* 1983. Vol. 18, № 12. P. 868–876

233. Nguyen K.H., Fromberg A. Monochloropropanediol and glycidyl esters in infant formula and baby food products on the Danish market: Occurrence and preliminary risk assessment // *Food Control.* 2020. Vol. 110. P. 106980.

234. Non-Carcinogen Tolerable Daily Intake (TDI) Values from US EPA [Электронный ресурс]. URL: http://www.popstoolkit.com/tools/HHRA/TDI_USEPA.aspx (дата обращения: 19.08.2021).

235. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Glycidol (CAS No. 556-52-5) In F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies) // *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser. United States*, 1990. Vol. 374. P. 1–229.

236. NTP toxicology and carcinogenesis Studies of 2,4-hexadienal (89% trans,trans isomer, CAS No. 142-83-6; 11% cis,trans isomer) (Gavage Studies) // *National Toxicology Program technical report series. United States*, 2003. № 509. 1–290 p.

237. Nuka E. et al. Metal-catalyzed oxidation of 2-alkenals generates genotoxic 4-oxo-2-alkenals during lipid peroxidation // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016. Vol. 80, № 10. P. 2007–2013.

238. Oarada M. et al. The effect of dietary lipid hydroperoxide on lymphoid tissues in mice // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. Vol. 960, № 2. P. 229–235.

239. Oliver-Pozo C. et al. Implementing Dynamic Headspace with SPME Sampling of Virgin Olive Oil Volatiles: Optimization, Quality Analytical Study, and Performance Testing // *J. Agric. Food Chem.* 2019. Vol. 67, № 7. P. 2086–2097.
240. Onami S. et al. Orally administered glycidol and its fatty acid esters as well as 3-MCPD fatty acid esters are metabolized to 3-MCPD in the F344 rat // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2015. Vol. 73, № 3. P. 726–731.
241. Ontañón I. et al. A modified commercial gas chromatograph for the continuous monitoring of the thermal degradation of sunflower oil and off-line solid phase extraction gas–chromatography–mass spectrometry characterization of released volatiles // *J. Chromatogr. A.* 2015. Vol. 1388. P. 52–59.
242. Oteng A.-B., Kersten S. Mechanisms of Action of trans Fatty Acids // *Adv. Nutr.* 2020. T. 11. № 3. C. 697–708.
243. Oueslati I. et al. Assessment of conventional and microwave heating effects on the variation of the bioactive compounds of Chétoui VOO using HPLC-DAD-ESI-TOF-MS // *Arab. J. Chem.* 2020. Vol. 13, № 1. P. 954–965.
244. Oueslati I. et al. Volatile molecular markers of VOO Thermo-oxidation: Effect of heating processes, macronutrients composition, and olive ripeness on the new emitted aldehydic compounds // *Food Res. Int.* 2018. Vol. 106. P. 654–665.
245. Owczarek-Fendor A. et al. Importance of Fat Oxidation in Starch-Based Emulsions in the Generation of the Process Contaminant Furan // *J. Agric. Food Chem.* 2010. Vol. 58, № 17. P. 9579–9586.
246. Parent R., Caravello H., Hoberman A. Reproductive study of acrolein on two generations of rats // *Fundam. Appl. Toxicol.* 1992. Vol. 19, № 2. P. 228–237.
247. Pawliszyn J.(eds.) *Handbook of Solid Phase Microextraction*. 1st Edition, Chemical Industry Press;2011, 496 p.
248. Petersen K.D. et al. Assessment of the oxidative stability of conventional and high-oleic sunflower oil by means of solid-phase microextraction-gas chromatography // *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2012. Vol. 63, № 2. P. 160–169.
249. Picklo M.J., Azenkeng A., Hoffmann M.R. Trans-4-oxo-2-nonenal potently alters mitochondrial function // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol. 50, № 2. P. 400–407
250. Pillon N.J. et al. Quantitative structure–activity relationship for 4-hydroxy-2-alkenal induced cytotoxicity in L6 muscle cells // *Chem. Biol. Interact.* 2010. Vol. 188, № 1. P. 171–180.
251. Ping P. et al. Cardiac toxic effects of trans-2-hexenal are mediated by induction of cardiomyocyte apoptotic pathways // *Cardiovasc. Toxicol.* 2003. Vol. 3, № 4. P. 341–351.

252. Pluskota-Karwatka D. et al. Formation of adducts in the reaction of glyoxal with 2'-deoxyguanosine and with calf thymus DNA // *Bioorg. Chem.* 2008. Vol. 36, № 2. P. 57–64.
253. Pravst I., Žmitek K., Žmitek J. Coenzyme Q10 Contents in Foods and Fortification Strategies // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2010. Vol. 50, № 4. P. 269–280.
254. Process for removing chloropropanols and/or glycidol, or their fatty acid esters, from glyceride oil, and an improved glyceride oil refining process comprising the same: patent WO2016189328A1 United States of America, PCT/GB2016/051558 / Goodrich P. et.al., filing date 27.05.2016; publication date 01.12.2016.
255. Pudel F. et al. On the necessity of edible oil refining and possible sources of 3-MCPD and glycidyl esters // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011. Vol. 113, № 3. P. 368–373.
256. Purcaro G. et al. Direct-immersion solid-phase microextraction coupled to fast gas chromatography mass spectrometry as a purification step for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oil // *J. Chromatogr. A.* 2013. Vol. 1307. P. 166–171.
257. Ratcliffe N. et al. A mechanistic study and review of volatile products from peroxidation of unsaturated fatty acids: an aid to understanding the origins of volatile organic compounds from the human body // *J. Breath Res.* 2020. Vol. 14, № 3. P. 034001.
258. Razak R.A.A. et al. Verification and evaluation of monochloropropanediol (MCPD) esters and glycidyl esters in palm oil products of different regions in Malaysia // *Food Addit. Contam. Part A.* 2019. Vol. 36, № 11. P. 1626–1636.
259. Robjohns S. et al. In vivo genotoxicity studies with 3-monochloropropan-1,2-diol // *Mutagenesis.* 2003. Vol. 18, № 5. P. 401–404.
260. Ruíz A., Cañada M.J.A., Lendl B. A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection // *Analyst.* 2001. Vol. 126, № 2. P. 242–246.
261. Rutckeviski R. et al. Thermo-Oxidative Stability Evaluation of Bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw) Oil // *Molecules.* 2017. Vol. 22, № 4. P. 606.
262. Salaspuro M. Local Acetaldehyde: Its Key Role in Alcohol-Related Oropharyngeal Cancer // *Visc. Med.* 2020. Vol. 36, № 3. P. 167–174.
263. Sanchez-Ortiz A. et al. Factors Limiting the Synthesis of Virgin Olive Oil Volatile Esters // *J. Agric. Food Chem.* 2012. Vol. 60, № 5. P. 1300–1307.
264. Santos J. et al. Analysis of Volatile Organic Compounds in Virgin Coconut Oil and their Sensory Attributes // *Philipp. J. Sci.* 2011. Vol. 140, № 2. P. 161–171.
265. Sarkisyan V. et. al. Beeswax Fractions Used as Potential Oil Gelling Agents // *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2021. № 98 (3). PP. 281–296

266. Sawada S. et al. Proteomic analysis of 3-MCPD and 3-MCPD dipalmitate toxicity in rat testis // *Food Chem. Toxicol.* 2015. Vol. 83. P. 84–92.
267. Schaich K.M. *Lipid Oxidation: New Perspectives on an Old Reaction* // *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Elsevier, 2020. P. 1–72.
268. Schilter B., Scholz G., Seefelder W. Fatty acid esters of chloropropanols and related compounds in food: Toxicological aspects // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011. Vol. 113, № 3. P. 309–313.
269. Schmidt K., Podmore I. Solid Phase Microextraction (SPME) Method Development in Analysis of Volatile Organic Compounds (Vocs) as Potential Biomarkers of Cancer // *J Mol Biomark Diagn.* 2015. Vol. 6, № 6. P. 1000253.
270. Schultrich K. et al. Absorption and metabolism of 3-MCPD in hepatic and renal cell lines // *Toxicol. Vitro.* 2021. Vol. 70. P. 105042.
271. Schultrich K. et al. Comparative proteomic analysis of 2-MCPD- and 3-MCPD-induced heart toxicity in the rat // *Arch. Toxicol.* 2017. Vol. 91, № 9. P. 3145–3155.
272. Schultrich K. et al. Effects of 2-MCPD on oxidative stress in different organs of male mice // *Food Chem. Toxicol.* 2020. Vol. 142. P. 111459.
273. Schupp T. Derivation of indoor air guidance values for volatile organic compounds (VOC) emitted from polyurethane flexible foam: VOC with repeated dose toxicity data // *EXCLI J.* 2018. Vol. 17. P. 784.
274. Scientific Committee on Food. Opinion on 3-monochloro-propane-1,2-diol (3-MCPD) [Электронный ресурс], 2001. P. 5. URL: https://c70b4efe-907b-40f4-a32b-0e0637fd087d/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fec.europa.eu%2Ffood%2Fsystem%2Ffiles%2F2016-10%2Fcs_contaminants_catalogue_mcpd_out91_en.pdf (дата обращения: 23.08.2021).
275. Semb T.N., Kristinova V. Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils. 2012. 115 p.
276. Senyildiz M., Alpertunga B., Ozden S. DNA methylation analysis in rat kidney epithelial cells exposed to 3-MCPD and glycidol // *Drug Chem. Toxicol.* 2016. Vol. 40, № 4. P. 432–439.
277. Shahab U. et al. Immunogenicity of DNA-advanced glycation end product fashioned through glyoxal and arginine in the presence of Fe³⁺: Its potential role in prompt recognition of diabetes mellitus auto-antibodies // *Chem. Biol. Interact.* 2014. Vol. 219. P. 229–240.

278. Silvagni A. et al. Thermoinduced Lipid Oxidation of a Culinary Oil: A Kinetic Study of the Oxidation Products by Magnetic Resonance Spectroscopies // *J. Phys. Chem. A*. 2010. Vol. 114, № 37. P. 10059–10065.
279. Silwood C.J.L., Grootveld M. Application of high-resolution, two-dimensional ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance techniques to the characterization of lipid oxidation products in autoxidized linoleoyl/linolenoylglycerols // *Lipids*. 1999. Vol. 34, № 7. P. 741.
280. Sixty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO, Expert Committee on Food Additives (JECFA). Safety evaluation of certain food additives and contaminants [Электронный ресурс], 2007. 269–315 p. URL: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=698> (дата обращения: 18.08.2021).
281. Skiera C. et al. ¹H-NMR spectroscopy as a new tool in the assessment of the oxidative state in edible oils // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2012. Vol. 89, № 8. P. 1383–1391.
282. Škulj S., Vazdar M. A Computational Insight into Reaction Between Different Amino Acids with Reactive Aldehydes 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal // *Croat. Chem. Acta*. 2019. Vol. 92, № 2. P. 229–239.
283. Smyth H. et al. Range-finding toxicity data: List VII // *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1969. Vol. 30, № 5. P. 470–476.
284. Sosinska E. et al. Spectroscopic characterisation of dimeric oxidation products of phytosterols // *Food Chem.* 2014. Vol. 151. P. 404–414.
285. Starski A. et al. Assessing exposure to 3-MCPD from bakery products based on monitoring studies undertaken throughout Poland // *Rocz. Państwowego Zakładu Hig.* 2013. Vol. 64, № 4. P. 277–283.
286. Stavridis J.C. Toxicity and Carcinogenicity of Aldehydes // *Oxidation: The Cornerstone of Carcinogenesis*. Springer, Dordrecht, 2008. P. 161–173.
287. Steffen A., Pawliszyn J. Analysis of Flavor Volatiles Using Headspace Solid-Phase Microextraction // *J. Agric. Food Chem.* 1996. Vol. 44, № 8. P. 2187–2193.
288. Sun H. et al. Determination of 2,4-decadienal in edible oils using reversed-phase liquid chromatography and its application as an alternative indicator of lipid oxidation // *J. Food Sci.* 2020. Vol. 85, № 5. P. 1418–1426.
289. Sun R. et al. Chemoproteomics Reveals Chemical Diversity and Dynamics of 4-Oxo-2-nonenal Modifications in Cells // *Mol. Cell. Proteomics*. 2017. Vol. 16, № 10. P. 1789–1800.
290. Sun Y. et al. Optimization of Headspace SPME GC × GC-TOF/MS Analysis of Volatile Organic Compounds in Edible Oils by Central Composite Design for Adulteration Detection of Edible Oil // *Food Anal. Methods*. 2020. Vol. 13, № 6. P. 1328–1336.

291. Svendsen C. et al. The food processing contaminant glyoxal promotes tumour growth in the multiple intestinal neoplasia (Min) mouse model // *Food Chem. Toxicol.* 2016. Vol. 94. P. 197–202.
292. Talbot G. *The Stability and Shelf Life of Fats and Oils // The Stability and Shelf Life of Food.* Woodhead Publishing, 2016. P. 461–503.
293. Talpur M.Y. et al. A simplified FTIR chemometric method for simultaneous determination of four oxidation parameters of frying canola oil // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2015. Vol. 149. P. 656–661.
294. Tanno R. et al. Analysis of oxidation products of α -tocopherol in extra virgin olive oil using liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Food Chem.* 2020. Vol. 306. P. 125582.
295. Tena N., Aparicio R., García-González D.L. Virgin olive oil stability study by mesh cell-FTIR spectroscopy // *Talanta.* 2017. Vol. 167. P. 453–461.
296. The international fragrance association. IFRA analytical method. Determination of the peroxide value [Электронный ресурс], 2019. 8 p. URL: https://ifrafragrance.org/docs/default-source/guidelines/20190910-revised-ifra-analytical-method-on-peroxide-value.pdf?sfvrsn=c4a931e2_0 (дата обращения 17.08.2019)
297. Tivanello R. et al. Effects of deodorization temperature and time on the formation of 3-MCPD, 2-MCPD, and glycidyl esters and physicochemical changes of palm oil // *J. Food Sci.* 2020. Vol. 85, № 7. P. 2255–2260.
298. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges // *Anal. Biochem.* 2017. Vol. 524. P. 13–30.
299. U.S. Environmental Protection Agency. Toxicological review of propionaldehyde. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). Washington, DC, 2008. 1–78 p.
300. Vazdar K. et al. Reaction Mechanism of Covalent Modification of Phosphatidylethanolamine Lipids by Reactive Aldehydes 4-Hydroxy-2-nonenal and 4-Oxo-2-nonenal // *Chem. Res. Toxicol.* 2017. Vol. 30, № 3. P. 840–850.
301. Vejux A., Samadi M., Lizard G. Contribution of Cholesterol and Oxysterols in the Physiopathology of Cataract: Implication for the Development of Pharmacological Treatments // *J. Ophthalmol.* 2011. Vol. 2011. P. 1–6.
302. Velasco J. et al. Quantitative determination of major oxidation products in edible oils by direct NP-HPLC-DAD analysis // *J. Chromatogr. A.* 2018. Vol. 1547. P. 62–70.

303. Velasco J. et al. Sensitive and accurate quantitation of monoepoxy fatty acids in thermoxidized oils by gas–liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2002. Vol. 982, № 1. P. 145–152.
304. Viau M. et al. Amounts of the reactive aldehydes, malonaldehyde, 4-hydroxy-2-hexenal, and 4-hydroxy-2-nonenal in fresh and oxidized edible oils do not necessary reflect their peroxide and anisidine values // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2016. Vol. 118, № 3. P. 435–444.
305. Vieira S.A., Zhang G., Decker E.A. Biological Implications of Lipid Oxidation Products // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2017. Vol. 94, № 3. P. 339–351.
306. Vogel M., Büldt A., Karst U. Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis – a critical review // *Fresenius. J. Anal. Chem.* 2000. Vol. 366, № 8. P. 781–791.
307. von Schönfels W. et al. Metabolic Signature of Electrosurgical Liver Dissection // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 9. P. e72022.
308. Waddell W.J. Thresholds of Carcinogenicity of Flavors // *Toxicol. Sci.* 2002. Vol. 68, № 2. P. 275–279.
309. Wang X. et al. 4-Hydroxy-2-Nonenal Mediates Genotoxicity and Bystander Effects Caused by *Enterococcus faecalis*–Infected Macrophages // *Gastroenterology*. 2012. Vol. 142, № 3. P. 543–551.
310. Wang Y. et al. Comparison of Furans Formation and Volatile Aldehydes Profiles of Four Different Vegetable Oils During Thermal Oxidation // *J. Food Sci.* 2019. Vol. 84, № 7. P. 1966–1978.
311. Wang Y. et al. trans, trans-2,4-Decadienal, a lipid peroxidation product, induces inflammatory responses via Hsp90- or 14–3–3ζ-dependent mechanisms // *J. Nutr. Biochem.* 2020. Vol. 76. P. 108286.
312. Wang Z. et al. Genetic dissection of 2-heptenal content in soybean (*Glycine max*) seed through genome-wide association study // *Crop Pasture Sci.* 2020. Vol. 71, № 10. P. 884–893.
313. Warner K., Eskin M.N. Methods to Access Quality and Stability of Oils and Fat-Containing Foods // *Methods to Access Quality and Stability of Oils and Fat-Containing Foods*. 1st ed. New York: Elsevier, 1995. 220 p.
314. 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. Vol. 110, № 2. P. 183–186.
315. Weisshaar R. Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011. Vol. 113, № 3. P. 304–308.

316. Weisshaar R., Perz R. Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010. Vol. 112, № 2. P. 158–165.
317. Wiley R.A. et al. Toxicity-distribution relationships among 3-alkylfurans in mouse liver and kidney // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984. Vol. 74, № 1. P. 1–9.
318. Wiley R.A. et al. Toxicity-distribution relationships among 3-alkylfurans in mouse liver and kidney // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984. Vol. 74, № 1. P. 1–9.
319. Wójcicki K. et al. Near and mid infrared spectroscopy and multivariate data analysis in studies of oxidation of edible oils // *Food Chem.* 2015. Vol. 187. P. 416–423.
320. World Health Organization WHO (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Evaluation of certain contaminants in food. Eighty-third report of the JointFAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Malta, 2017. 1–182 p.
321. Wu S., Yen G., Sheu F. Mutagenicity and identification of mutagenic compounds of fumes obtained from heating peanut oil // *J. Food Prot.* 2001. Vol. 64, № 2. P. 240–245.
322. Xia W., Budge S.M. GC-MS Characterization of Hydroxy Fatty Acids Generated From Lipid Oxidation in Vegetable Oils // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2018. Vol. 120, № 2. P. 1700313.
323. Xia W., Budge S.M. Simultaneous quantification of epoxy and hydroxy fatty acids as oxidation products of triacylglycerols in edible oils // *J. Chromatogr. A.* 2018. Vol. 1537. P. 83–90.
324. Xia W., Budge S.M. Techniques for the Analysis of Minor Lipid Oxidation Products Derived from Triacylglycerols: Epoxides, Alcohols, and Ketones // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2017. Vol. 16, № 4. P. 735–758.
325. Xia W., Budge S.M., Lumsden M.D. New ¹H NMR-Based Technique To Determine Epoxide Concentrations in Oxidized Oil // *J. Agric. Food Chem.* 2015. Vol. 63, № 24. P. 5780–5786.
326. Xing H.Z. et al. 3-Monochloropropane-1, 2-diol causes irreversible damage to reproductive ability independent of hormone changes in adult male rats // *Food Chem. Toxicol.* 2019. Vol. 124. P. 10–16.
327. Xu L. et al. Evaluation of glycerol core aldehydes formation in edible oils under restaurant deep frying // *Food Res. Int.* 2020. Vol. 137. P. 109696.
328. Xu L. et al. Monitoring oxidative stability and changes in key volatile compounds in edible oils during ambient storage through HS-SPME/GC–MS // *Int. J. Food Prop.* 2018. Vol. 20. P. S2926–S2938.

329. Yan C. et al. Trans, trans-2,4-decadienal (tt-DDE), a composition of cooking oil fumes, induces oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in human corneal epithelial cells // *Toxicol. Vitro*. 2020. Vol. 68. P. 104933.
330. Yang C.M. et al. Rapid quantitation of thermal oxidation products in fats and oils by ¹H-NMR spectroscopy // *Nutr. Cancer*. Taylor & Francis Group, 2009. Vol. 30, № 1. P. 64–68.
331. Yang P. et al. Ninety-Day Nephrotoxicity Evaluation of 3-MCPD 1-Monooleate and 1-Monostearate Exposures in Male Sprague Dawley Rats Using Proteomic Analysis // *J. Agric. Food Chem.* 2020. Vol. 68, № 9. P. 2765–2772.
332. Yang X., Boyle R.A. Sensory Evaluation of Oils/Fats and Oil/Fat-Based Foods // *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. AOCS Press, 2016. P. 157–185.
333. Young S.-C. et al. DNA damages induced by trans, trans-2,4-decadienal (tt-DDE), a component of cooking oil fume, in human bronchial epithelial cells // *Environ. Mol. Mutagen.* 2010. Vol. 51, № 4. P. 315–321.
334. Zailer E., Holzgrabe U., Diehl B.W.K. Interlaboratory Comparison Test as an Evaluation of Applicability of an Alternative Edible Oil Analysis by ¹H NMR Spectroscopy // *J. AOAC Int.* 2017. Vol. 100, № 6. P. 1819–1830.
335. Zeb A. Chemistry and liquid chromatography methods for the analyses of primary oxidation products of triacylglycerols // *Free Radic. Res.* 2015. Vol. 49, № 5. P. 549–564.
336. Zeb A. Triacylglycerols composition, oxidation and oxidation compounds in camellia oil using liquid chromatography–mass spectrometry // *Chem. Phys. Lipids.* 2012. Vol. 165, № 5. P. 608–614.
337. Zeb A., Ahmad S. Changes in Acylglycerols Composition, Quality Characteristics and In vivo Effects of Dietary Pumpkin Seed Oil upon Thermal Oxidation // *Front. Chem.* 2017. Vol. 5. P. 55.
338. 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. Vol. 77. P. 65–75.
339. Zenk P. et al. Toxicity of alkyldihydrofurans to metabolically active organs in the mouse // *Toxicology.* 1990. Vol. 61, № 1. P. 47–57.
340. Zhang N. et al. Analytical methods for determining the peroxide value of edible oils: A mini-review // *Food Chem.* 2021. Vol. 358. P. 129834.
341. Zhang N. et al. Detection of 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine adducts in genomic DNA by ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass

spectrometry in combination with stable isotope dilution // *J. Chromatogr. A*. 2016. Vol. 1450. P. 38–44.

342. Zhang Z. et al. Synthesis of 2-Monochloropropanol Fatty Acid Esters and Their Acute Oral Toxicities in Swiss Mice // *J. Agric. Food Chem.* 2019. Vol. 67, № 13. P. 3789–3795.

343. Zhao J. et al. Mass Spectrometric Evidence of Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal Adductions to Radical-Scavenging Soy Peptides // *J. Agric. Food Chem.* 2012. Vol. 60, № 38. P. 9727–9736.

344. Zhao Y. et al. Formation of 3-MCPD Fatty Acid Esters from Monostearoyl Glycerol and the Thermal Stability of 3-MCPD Monoesters // *J. Agric. Food Chem.* 2016. Vol. 64, № 46. P. 8918–8926.

345. Zheng L. et al. Insights into effects of temperature and ultraviolet light on degradation of tocopherols with HPLC and UPC2-QTOF-MS // *LWT*. 2020. Vol. 126. P. 109302.

346. Zhu H. et al. Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Analysis of Volatile Carbonyl Compounds in Virgin Olive Oils // *J. Agric. Food Chem.* 2013. Vol. 61, № 50. P. 12253–12259.

347. Zuo W. et al. Development of an Improved Method to Determine Saturated Aliphatic Aldehydes in Docosahexaenoic Acid-Rich Oil: A Supplement to p-Anisidine Value // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2017. Vol. 119, № 12.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Заключение о соответствии методики измерений установленным метрологическим характеристикам.

ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора	Регистрационный 01ФЦ-3915-2018 от 09.10.2018	Страница 1 из 2
--------------------------------	---	-----------------

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ» РОСПОТРЕБНАДЗОРА
(ФБУЗ «ФЦГиЭ Роспотребнадзора»)

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.310430

Юридический адрес:
117105, Москва, Варшавское ш., 19А

Телефон: (495) 954 45 36, факс: (495) 954-03-10;
e-mail: gsen@fcgie.ru, http://www.fcgsie.ru

ОКПО 01909971, ОГРН 1037700255999
ИНН/КПП 7726008570/772601001

№РОСС RU.0001.310430/0062

ЗАКЛЮЧЕНИЕ
о соответствии методики (метода) измерений
установленным метрологическим характеристикам

Методика (метод) измерений Определение содержания 3-монохлорпропан-
(наименование измеряемой величины, объекта)
диола, 2-монохлорпропандиола и глицидиола в пищевых растительных маслах и
животных жирах

Разработанная ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»
(наименование юридического лица, разработавшего МИ, адрес)
109240, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14

Вывод: В результате оценки МИ установлено, что МИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками, указанных в приложении.

Приложение: метрологические характеристики методики измерений в 1 экземпляре на 1 листе.

Зав. отделом метрологического и
нормативно-методического обеспечения
Главный метролог



А.А. Гарбузова

Дата выдачи: « 15 » апреля 2019 г.

ФБУЗ ФЦГиЭ
Роспотребнадзора

Регистрационный 01ФЦ-3915-2018 от
09.10.2018

Страница 2 из 2

Приложение к заключению о соответствии методики (метода) измерений
установленным метрологическим характеристикам

Наименование методики (метода): «Определение содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и животных жирах»

Таблица 1. Значения характеристики погрешности, нормативов оперативного контроля точности, повторяемости, воспроизводимости

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности $P=0,95$), $\pm\delta, \%$	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), $\sigma_r, \%$	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), $\sigma_R, \%$	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), $r, \%$	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), $R, \%$ ($P=0,95$)	Средняя полнота извлечения вещества, $\%$
3-МХПД							
пищевые растительные масла и животные жиры	0,3-30,0	50	9,4	10,7	26	30	113,6
2-МХПД							
пищевые растительные масла и животные жиры	0,3-30,0	35	9,2	8,3	26	23	107,9
Глицидол							
пищевые растительные масла и животные жиры	0,3-30,0	69	9,2	16,5	26	46	87,5

Приложение Б. Свидетельство о метрологической аттестации методики определения содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и животных жирах методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС).

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ» РОСПОТРЕБНАДЗОРА
(ФБУЗ «ФЦГиЭ Роспотребнадзора»)

Юридический адрес: Варшавское шоссе, 19 А, Москва, 117105

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.310430

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики (метода) измерений
№ РОСС RU.0001.310430/0062.28.05.19

Методика (метод) измерений Определение содержания 3-монохлорпропандиола,
(наименование измеряемой величины, объекта)
2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и
животных жирах

Разработанная ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»
(наименование юридического лица, разработавшего МИ, адрес)

109240, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14

и регламентированная в МУК 4.1.3547-19 «Определение содержания 2-монохлорпро-
пандиола, 3-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и
животных жирах»

(обозначение и наименование документа, год утверждения)

аттестована в соответствии с **ГОСТ Р 8.563-2009**

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы
материалов по разработке МИ

(вид работ: метрологическая экспертиза материалов по разработке МИ, теоретическое или экспериментальное исследование МИ, другие виды работ)

В результате аттестации МИ установлено, что МИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками, приведенными в приложении.

Документ на МИ содержит 15 страниц

Приложение: метрологические характеристики методики измерений в 1 экземпляре на 1 листе.

Главный врач



В.Ю. Ананьев

Дата выдачи: «28» мая 2019 г.

Приложение к свидетельству № РОСС RU.0001.310430/0062.28.05.19

об аттестации методики (метода) измерений: «Определение содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и животных жирах»

Таблица 1. Значения характеристики погрешности, нормативов оперативного контроля точности, повторяемости, воспроизводимости.

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности $P=0,95$), $\pm\delta, \%$	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), $\sigma_r, \%$	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), $\sigma_R, \%$	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), $r, \%$	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), $R, \%, (P=0,95)$	Средняя полнота извлечения вещества, $\%$
3-МХПД							
пищевые растительные масла и животные жиры	0,3-30,0	50	9,4	10,7	26	30	113,6
2-МХПД							
пищевые растительные масла и животные жиры	0,3-30,0	35	9,2	8,3	26	23	107,9
Глицидол							
пищевые растительные масла и животные жиры	0,3-30,0	69	9,2	16,5	26	46	87,5

Главный метролог



Гарбузова А.А.

Приложение В. Отчёт по метрологической оценке методики определения содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и животных жирах методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС).

1. Методика предназначена для измерения содержания 3-монохлорпропандиола, 2-монохлорпропандиола и глицидола в пищевых растительных маслах и животных жирах с целью санитарно-гигиенического контроля.

Диапазон измеряемых концентраций: 0,3 – 30 мкг/кг.

2. При разработке методики выполнения измерений (МВИ) использованы:

3-монохлорпропан-1,2-диол (2-МХПД) (кат. №С379710 TRC);

Глицидол (кат. №G615700 TRC);

3-монохлорпропан-1,2-диол-1,1,2,3,3-d5 (3-МХПД-D5) (кат. №32401 Sigma-Aldrich);

3-монобромпропан-1,2-диол-1,1,2,3,3F-d5 (3-МБПД-D5) (кат. №B686657 TRC);

1,2-дипальмитоил-3-монохлорпропандиол-1,1,2,3,3-d5 (1,2-дипальмитат-3-МХПД-d5; би-3-МХПД-d5) (кат. № B515202 TRC);

1,3- дипальмитоил-2- монохлорпропандиол-1,1,2,3,3-d5 (1,3-бипальмитат-2- МХПД -d5; би-2-МХПД-d5) (кат. № D486842 TRC);

1,2-дипальмитоил-3-монохлорпропандиол (1,2-дипальмитат-3-МХПД; би-3-МХПД) (кат. №B515200 TRC);

1,3- дипальмитоил-2-монохлорпропандиол (1,3-дипальмитат-2-МХПД; би-2-МХПД) (кат. №D486840 TRC)

Глицидол пальмитат (кат. №G615950 TRC)

Кислота фенилборная (ФБК) (кат. №P319590 TRC);

Метанол (для ВЭЖХ);

Толуол (для ВЭЖХ);

Изооктан (для ВЭЖХ);

Натрия гидроксид, х.ч., ГОСТ 4328-77;

Эфир диэтиловый, х.ч., ТУ 2600-001-45682126-13;

Этилацетат, х.ч., ГОСТ 22300-76;

Натрий бромистый, х.ч., ТУ 6-09-5331-87

Гексан, х.ч., СТП ТУ СОМР 2-008-06;

Кислота ортофосфорная, х.ч., ГОСТ 6552-80

Вода для лабораторного анализа по ГОСТ Р 52501, первой степени чистоты;

Гелий со степенью чистоты не менее 99,9999%, ТУ 0271-001-45905715-02.

Средства измерений

Газовый хроматограф Agilent 7890A, оснащённый тройным квадрупольным масс-селективным детектором 7000С (свидетельство о поверке № СП2298769 от 05.12.2018);

Хроматографическая колонка HP-5MS 30м×0,25мм×0,25 мкм;

Весы неавтоматического действия по ГОСТ Р 53228 специального класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности $\pm 0,0005$ г (свидетельство о поверке № СП2300183 от 15.11.2018)

Одноканальные автоматические пипетки переменного объёма вместимостью 20-200 мм³ и пределом допустимой погрешности 2,0% (сертификат о калибровке № СК0207095 от 02.11.2018); 100-1000 мм³ и пределом допустимой погрешности 1,0% (сертификат о калибровке № СК0201065 от 03.11.2018); 500-5000 мм³ и пределом допустимой погрешности 1,0% (сертификат о калибровке № СК0200904 от 02.11.2018);

Цилиндр мерный объёмом 100 см³ по ГОСТ 1770-74;

Цилиндр мерный объёмом 25 см³ по ГОСТ 1770-74;

Колбы мерные на 2-25-2, 2-50-2 и 2-100-2 по ГОСТ1770-74;

3. Погрешность измерения концентраций и её составляющие определены на основе процедур контроля погрешности в соответствии с нормативными документами:

– ГОСТ Р ИСО 5725-(1-6)-2002. «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». Ч. 1,2,4,5.;

– РМГ 61-2010. Рекомендации по межгосударственной стандартизации. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки;

– РМГ 76-2014. Рекомендации по межгосударственной стандартизации. Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

Оценка показателя повторяемости выполнена в соответствии с РМГ 61-2010 (п.5.2.1., С. 15-17) и РМГ 76-2014 (Приложение Б, п. Б.3.2.3., С. 66-67).

Рассчитывают среднее арифметическое значение \bar{X}_{ml} и выборочную дисперсию S_{ml}^2 результатов единичного анализа содержаний компонента в образце для оценивания (ОО), полученных в условиях повторяемости (параллельные определения), по ним оценивают среднее квадратичное отклонение (СКО), характеризующие повторяемость результатов единичного анализа.

$$\bar{X}_{ml} = \left(\sum_{i=1}^n x_{mli} \right) / n ;$$

$$S_{ml}^2 = \left(\sum_{i=1}^n (x_{mli} - \bar{x}_{ml})^2 \right) / n - 1$$

$m = 1, \dots, M$ (число образцов); $l = 1, \dots, L$ (число контрольных измерений),

где \bar{x}_{ml} – среднее арифметическое значение;

S_{ml}^2 – выборочная дисперсия.

Показатель повторяемости результатов анализа в виде среднего квадратичного (стандартного) отклонения повторяемости (СКО, σ_m) для содержаний, соответствующих содержанию компонента в m -м образце, устанавливают, принимая равным $S_{r,m}$: СКО рассчитывают по формуле:

$$S_r = \sqrt{\sum_{m=1}^M [(S_{ml})^2 / M]}$$

$$\sigma_r = S_r$$

Предел повторяемости (r_n) рассчитывают в соответствии с РМГ 61-2010 (п. 5.2.1., С.17) и РМГ 76-2014 (Приложение Б, п. Б 3.2.3.6) по формуле:

$$r_n = Q(P, n) \cdot \sigma_r, \text{ где}$$

$Q(P, n)$ – коэффициент, зависящий от числа контрольных определений и доверительной вероятности P . При двух параллельных определениях ($n = 2$) и $P = 0,95$, $Q(P, n) = 2,77$ (2,8), т.е. $r_2 = 2,8 \sigma_r$,

σ_r – значение СКО повторяемости.

Показатель воспроизводимости в виде среднего квадратичного отклонения воспроизводимости (σ_R) рассчитан теоретически (исходя из предположения симметричности и одномодальности распределения погрешности результатов анализа и при условии $|\Delta_n| = \Delta_v = \Delta$, (РМГ 61-2010, п. 4.8., примечание 2, С. 11; РМГ 76-2014).

$\sigma_R = \zeta \sigma_r$, где ζ – коэффициент, зависящий от объекта анализа и методики, составляющий 1,4-2,2.

$$\sigma_R = 1,4 \cdot \sigma_r$$

Предел воспроизводимости (R) для двух результатов анализа рассчитывают по формуле:

$$R = Q(P, 2) \cdot \sigma_R,$$

где $Q(P, 2) = 2,77$ (2,8) при $P = 0,95$.

$$R = 2,8 \cdot \sigma_R$$

Показатели качества методики анализа (в виде характеристики погрешности и её составляющих) оценены с применением расчётно-экспериментального метода (РМГ 61-2010, приложение В).

Погрешность измерения концентраций складывается из суммы неисключённой систематической и случайной составляющей погрешностей, т.е.

$$S_{\text{сум}}^2 = \delta_c^2 + \sigma_R^2$$

Показатель точности определяется согласно РМГ 61-2010 (п.5.4.) как

$$\delta = 1,96 \sqrt{S_{\text{сум}}^2}$$

3.1. Определение отдельных составляющих неисключённой систематической погрешности результатов измерений.

Неисключённая систематическая погрешность (НСП) складывается из погрешностей: приготовления растворов (\mathcal{G}_{np}), построения градуировочного графика (\mathcal{G}_2), прибора (\mathcal{G}_n), измерения концентрации вещества ($\mathcal{G}_{изм}$).

3.1.1. 3-МХПД.

3.1.1.1. Погрешность приготовления растворов.

НСП приготовления растворов аналита с добавлением внутреннего стандарта (\mathcal{G}_{np} (3-МХПД)) складывается из погрешностей взвешивания ($\mathcal{G}_{1.1}$), измерения объёмов растворов в мерных колбах ($\mathcal{G}_{1.2}$) и одноканальными автоматическими пипетками ($\mathcal{G}_{1.3}$), а также погрешностей чистоты реактивов ($\mathcal{G}_{1.4}$).

3.1.1.1.1. Погрешность взвешивания 3-МХПД ($\mathcal{G}_{1.1}$) определяется погрешностью аналитических весов. Взвешивание навески массой 0,01 г на весах 1-го класса точности (специальный) по ГОСТ Р 53228-2008 с погрешностью 0,0001 г приводит к погрешности взвешивания:

$$\mathcal{G}_{1.1} = \pm 1,0 \%$$

3.1.1.1.2. НСП измерения объёма раствора 3-МХПД в мерной колбе вместимостью 100 см³ (2-го класса точности) с погрешностью 0,2 см³ (ГОСТ 1770-74) составляет:

$$\mathcal{G}_{1.2.1} = \pm 0,2 \%$$

НСП измерения объёма раствора внутреннего стандарта 3-МХПД-d5 в мерной колбе вместимостью 50 см³ (2-го класса точности) с погрешностью 0,12 см³ (ГОСТ 1770-74) составляет (процедура повторяется 2 раза):

$$\mathcal{G}_{1.2.2} = \pm \sqrt{2 \cdot (0,12)^2} = \pm 0,17 \%$$

3.1.1.1.3. НСП измерения объёмов раствора 3-МХПД автоматическими пипетками на 100-1000 мм³ и 500-5000 мм³ (2-го класса точности) а также измерения объёма

внутреннего стандарта 3-МХПД-d5 автоматической пипеткой на 20-200 мм³ (2-го класса точности). Выбирается максимальная погрешность, обусловленная отбором 50 мм³ раствора внутреннего стандарта пипеткой на 20-200 мм³ с погрешностью ± 2,0 %; 500, 100 и 600 мм³ совместного раствора 3-МХПД и глицидола и 1000 мм³ растворителя с применением автоматической пипетки вместимостью 100-1000 мм³ с погрешностью по ± 1,0%, а также отбором 2500 мм³ раствора внутреннего стандарта 3-МХПД-d5 и 9500 и 9900 мм³ растворителя с применением пипетки вместимостью 500-5000 мм³ с погрешностью по ± 1,0%:

$$g_{1,3} = \pm \sqrt{(2,0)^2 + 9 \cdot (1,0)^2} = \pm 3,61 \%$$

3.1.1.1.3. НСП чистоты реактивов $g_{1,4}$ определяется содержанием основного вещества в составе 3-МХПД - 99,4% и внутреннего стандарта 3-МХПД-d5 – 97%, а также изотопной чистоты последнего – 97,7%:

$$g_{1,4,1} = 0,6 \%$$

$$g_{1,4,2} = 3,0 \%$$

$$g_{1,4,3} = 2,3 \%$$

Погрешность приготовления растворов $g_{3-МХПД}$ составляет:

$$g_{np(3-МХПД)} = \pm \sqrt{g_{1,1}^2 + g_{1,2,1}^2 + g_{1,2,2}^2 + g_{1,3}^2 + g_{1,4,1}^2 + g_{1,4,2}^2 + g_{1,4,3}^2} = 5,36 \%$$

3.1.1.2. Погрешность построения градуировочных графиков (g_2) рассчитана, исходя из экспериментальных данных в 5-ти точках при проведении 5-ти измерений в каждой точке для анализируемого вещества (таблица 1):

Таблица 1. Данные для построения и метрологической оценки градуировочной характеристики (в качестве показателя отклика прибора использовалось соотношение площадей пика аналита к площади пика внутреннего стандарта).

Номер опыта	Концентрация 3-МХПД в образце, С, мкг/мл	Соотношение площадей пиков, А	/ΔА/ = Ai - Асп	ΔСmax соотв. ΔАmax мкг/кг	$\frac{\Delta C_{max} \cdot 100}{C}$, % (g_2)	Стандартное отклонение I	Отн. станд. отклон. (%)
1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,05	0,0547	0,0001	0,0487	10,5	0,003	6,727
2		0,0604	0,0058	0,0538			
3		0,0516	0,0030	0,0458			
4		0,0514	0,0031	0,0458			
5		0,0547	0,0001	0,0487			
1	0,2	0,2020	0,0263	0,1797	11,7	0,013	6,474
2		0,2348	0,0065	0,2090			
3		0,2345	0,0062	0,2087			
4		0,2332	0,0050	0,2075			

5		0,2368	0,0086	0,2107			
1	0,5	0,5773	0,0121	0,5138	2,2	0,008	1,495
2		0,5630	0,0022	0,5012			
3		0,5550	0,0102	0,4940			
4		0,5615	0,0037	0,4997			
5		0,5693	0,0041	0,5067			
1	2	2,0543	0,0943	1,8283	4,2	0,059	3,073
2		2,2155	0,0669	1,9718			
3		2,1078	0,0408	1,8760			
4		2,1888	0,0402	1,9482			
5		2,1765	0,0279	1,9372			
1	5	5,7857	0,1291	5,1497	2,3	0,073	1,459
2		5,6261	0,0305	5,0077			
3		5,6419	0,0147	5,0217			
4		5,5605	0,0961	4,9490			
5		5,6688	0,0122	5,0453			

Градуировочная характеристика, выражающая линейную (с угловым коэффициентом) зависимость площадей хроматографических пиков от концентрации 3-МХПД в растворе, построена в диапазоне 0,05 – 5 мкг/мл.

Формула зависимости соотношений площадей хроматографических пиков анализируемого вещества и внутреннего стандарта (S) от соотношений их концентраций (C) имеет вид:

$$S=0,563543 \cdot C - 0,013394 \quad (r=0,999).$$

$$\Delta C_{\max} = (\Delta S_{\max} + 0,013394) / 0,563543.$$

Из таблицы выбирается максимальное значение погрешности:

$$\mathcal{G}_2 = \pm 11,7\% \text{ (3-МХПД)}.$$

3.1.1.3. Погрешность прибора \mathcal{G}_n (жидкостного хроматографа с масс-детектором) определяется по экспериментальным данным с применением градуировочных растворов и соответствует относительному среднему квадратичному отклонению выходного сигнала (таблица 1). Выбирается максимальное значение погрешности:

$$\mathcal{G}_n = \pm 6,73 \text{ \%}.$$

3.1.2. Глицидол.

3.1.2.1. Погрешность приготовления растворов.

НСП приготовления растворов аналита с добавлением внутреннего стандарта (\mathcal{G}_{np} (глицидол)) складывается из погрешностей взвешивания ($\mathcal{G}_{1.1}$), измерения объёмов растворов в мерных колбах ($\mathcal{G}_{1.2}$), одноканальными автоматическими пипетками ($\mathcal{G}_{1.3}$) и мерными цилиндрами ($\mathcal{G}_{1.4}$), а также погрешностей чистоты реактивов ($\mathcal{G}_{1.5}$).

3.1.2.1.1. Погрешность взвешивания глицидола $\mathcal{G}_{1.1}$ определяется погрешностью аналитических весов. Взвешивание навески массой 0,01 г на весах 1-го класса точности

(специальный) по ГОСТ Р 53228-2008 с погрешностью 0,0001 г приводит к погрешности взвешивания:

$$g_{1.1} = \pm 1,0 \%$$

3.1.2.1.2. НСП измерения объёма раствора глицидола в мерной колбе вместимостью 100 см³ (2-го класса точности) с погрешностью 0,2 см³ (ГОСТ 1770-74) составляет:

$$g_{1.2.1} = \pm 0,2 \%$$

НСП измерения объёма раствора внутреннего стандарта 3-МБПД-d5 в мерной колбе вместимостью 50 см³ (2-го класса точности) с погрешностью 0,12 см³ (ГОСТ 1770-74) составляет (процедура повторяется 2 раза):

$$g_{1.2.2} = \pm \sqrt{2 \cdot (0,12)^2} = \pm 0,17 \%$$

3.1.2.1.3. НСП измерения объёмов раствора глицидола автоматическими пипетками на 100-1000 мм³ и 500-5000 мм³ (2-го класса точности), а также измерения объёма внутреннего стандарта 3-МБПД-d5 пипеткой на 20-200 мм³ (2-го класса точности). Выбирается максимальная погрешность, обусловленная отбором 50 мм³ раствора внутреннего стандарта с применением пипетки вместимостью 20-200 мм³, с погрешностью 2,0 %; 500, 100 и 600 мм³ совместного раствора 3-МХПД и глицидола и 1000 мм³ растворителя с применением автоматической пипетки вместимостью 100-1000 мм³, с погрешностями по 1,0 %, а также отбором 9500 и 9900 мм³ растворителя с применением автоматической пипетки вместимостью 500-5000 мм³, с погрешностями по 1,0 %:

$$g_{1.3} = \pm \sqrt{(2,0)^2 + 8 \cdot (1,0)^2} = \pm 3,46 \%$$

3.1.2.1.4. НСП измерения объёма раствора внутреннего стандарта 3-МБПД-d5 мерным цилиндром вместимостью 25 см³ (2-го класса точности) с погрешностью 0,5 % (ГОСТ 1770-74) составляет:

$$g_{1.4} = \pm 0,5 \%$$

3.1.2.1.5. НСП чистоты реактивов $g_{1.5}$ определяется содержанием основного вещества в составе глицидола – 95% и внутреннего стандарта 3-МБПД-d5- 97%, а также изотопной чистоты последнего – 98,4%:

$$g_{1.5.1} = 5 \%$$

$$g_{1.5.2} = 3 \%$$

$$g_{1.5.3} = 1,6 \%$$

Погрешность приготовления растворов для расчёта содержания глицидола g_2 составляет:

$$g_{пр}(\text{глицидол}) = \pm \sqrt{g_{1.1}^2 + g_{1.2.1}^2 + g_{1.2.2}^2 + g_{1.3}^2 + g_{1.4}^2 + g_{1.5.1}^2 + g_{1.5.2}^2 + g_{1.5.3}^2} = 7,06 \%$$

3.1.2.2. Погрешность прибора g_n (жидкостного хроматографа с масс-детектором) определяется по экспериментальным данным с применением градуировочных растворов и соответствует относительному среднему квадратичному отклонению выходного сигнала (таблица 1). Выбирается максимальное значение погрешности:

$$g_n = \pm 4,62 \% \text{ (глицидол);}$$

3.1.2.3. Погрешность построения градуировочных графиков (g_2) рассчитана, исходя из экспериментальных данных в 5-ти точках при проведении 5-ти измерений в каждой точке для анализируемого вещества (таблица 2):

Таблица 2. Данные для построения и метрологической оценки градуировочной характеристики (в качестве показателя отклика прибора использовалось соотношение площадей пика аналита к площади пика внутреннего стандарта).

Номер опыта	Концентрация глицидола в образце, С, мкг/мл	Соотношение площадей пиков, А	/ΔА/ = Ai - Асп	ΔСmax соотв. ΔАmax мкг/кг	$\frac{\Delta C_{\max} \cdot 100}{C}$, % (g_2)	Стандартное отклонение I	Отн. станд. отклон. (%)
1	2	3	4	5	6	7	
1	0,05	0,1205	0,0068	0,0702	7,3	0,003	4,621
2		0,1196	0,0058	0,0698			
3		0,1083	0,0055	0,0643			
4		0,1144	0,0006	0,0673			
5		0,1060	0,0078	0,0633			
1	0,2	0,4145	0,0056	0,2120	2,1	0,003	1,469
2		0,4137	0,0065	0,2117			
3		0,4190	0,0012	0,2142			
4		0,4246	0,0044	0,2168			
5		0,4290	0,0088	0,2190			
1	0,5	0,9402	0,0204	0,4655	2,4	0,009	1,963
2		0,9519	0,0086	0,4710			
3		0,9486	0,0119	0,4695			
4		0,9852	0,0247	0,4872			
5		0,9767	0,0162	0,4830			
1	2	4,0195	0,0275	1,9507	1,3	0,019	0,944
2		4,0075	0,0395	1,9447			
3		4,0693	0,0223	1,9747			
4		4,0365	0,0105	1,9590			
5		4,1022	0,0552	1,9902			
1	5	10,5864	6,5394	5,1167	3,1	0,100	2,003
2		10,4466	6,3996	5,0493			
3		10,5015	6,4545	5,0760			
4		10,2984	6,2513	4,9780			
5		10,0559	6,0089	4,8608			

Градуировочная характеристика, выражающая линейную (с угловым коэффициентом) зависимость площадей хроматографических пиков от концентрации глицидола в растворе, построена в диапазоне 0,05 – 5 мкг/мл.

Формула зависимости соотношений площадей хроматографических пиков анализируемого вещества и внутреннего стандарта (S) от соотношений их концентраций (C) имеет вид:

$$S=1,728238 \cdot C-0,025106 \quad (r=0,999).$$

$$\Delta C_{\max}=(\Delta S_{\max}+0,025106) / 1,728238.$$

Из таблицы выбирается максимальное значение погрешности:

$$g_s = \pm 7,3\% \text{ (глицидол)}.$$

3.1.3. 1,2-дипальмитоил-3-МХПД.

3.1.3.1. Погрешность приготовления растворов.

НСП приготовления растворов аналита с добавлением внутреннего стандарта (g_{np} (ди-3-МХПД)) складывается из погрешностей измерения объёмов растворов в мерных колбах ($g_{1.1}$) и измерения объёмов одноканальными автоматическими пипетками ($g_{1.2}$), а также погрешностей чистоты реактивов ($g_{1.3}$).

3.1.3.1.1. НСП измерения объёма раствора 1,2-дипальмитоил-3-МХПД в мерной колбе вместимостью 100 см³ (2-го класса точности) с погрешностью 0,2 см³ (ГОСТ 1770-74) составляет:

$$g_{1.1.1} = \pm 0,2 \%$$

НСП измерения объёма раствора внутреннего стандарта 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5 в мерной колбе вместимостью 25 см³ (2-го класса точности) с погрешностью 0,08 см³ (ГОСТ 1770-74) составляет (процедура повторяется 2 раза):

$$g_{1.1.2} = \pm \sqrt{2 \cdot (0,08)^2} = \pm 0,11 \%$$

3.1.3.1.2. НСП измерения объёмов раствора 1,2-дипальмитоил-3-МХПД автоматическими пипетками на 100-1000 мм³ и 500-5000 мм³ (2-го класса точности), а также измерения объёмов внутреннего стандарта 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5 пипеткой на 20-200 мм³ (2-го класса точности). Выбирается максимальная погрешность, обусловленная отбором 100 мм³ раствора внутреннего стандарта с применением пипетки вместимостью 20-200 мм³, с погрешностью 2,0 %; 500, 100 и 600 мм³ раствора 1,2-дипальмитоил-3-МХПД и 1000 мм³ растворителя с применением пипетки вместимостью 100-1000 мм³, с погрешностями по 1,0 %, а также отбором 6400 мм³ раствора внутреннего стандарта и 9500 и 9900 мм³ растворителя с применением пипетки вместимостью 500-5000 мм³, с погрешностями по 1,0 %:

$$g_{1.2} = \pm \sqrt{(2,0)^2 + 9 \cdot (1,0)^2} = \pm 3,61 \%$$

3.1.3.1.3. НСП чистоты реактивов $g_{1.3}$ определяется содержанием основного вещества в составе 1,2-дипальмитоил-3-МХПД – 98% и внутреннего стандарта 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5- 98%, а также изотопной чистоты последнего – 98%:

$$g_{1.3.1} = 2 \%$$

$$g_{1.3.2} = 2 \%$$

$$g_{1.3.3} = 2 \%$$

Погрешность приготовления растворов g_{np} (du-3-МХПД) составляет:

$$g_{np} (du-3-МХПД) = \pm \sqrt{g_{1.1.1}^2 + g_{1.1.2}^2 + g_{1.2}^2 + g_{1.3.1}^2 + g_{1.3.2}^2 + g_{1.3.3}^2} = 5,01 \%$$

3.1.3.2. Погрешность прибора g_n (жидкостного хроматографа с масс-детектором) определяется по экспериментальным данным с применением градуировочных растворов и соответствует относительному среднему квадратичному отклонению выходного сигнала (таблица 1). Выбирается максимальное значение погрешности:

$$g_n = \pm 4,34 \%$$

3.1.3.3. Погрешность построения градуировочных графиков (g_2) рассчитана, исходя из экспериментальных данных в 5-ти точках при проведении 5-ти измерений в каждой точке для анализируемого вещества (таблица 3):

Таблица 3. Данные для построения и метрологической оценки градуировочной характеристики (в качестве показателя отклика прибора использовалось соотношение площадей пика аналита к площади пика внутреннего стандарта).

Номер опыта	Концентрация 3-МХПД в пробе, С, мкг/мл	Соотношение площадей пиков, А	/ΔА/ = Ai - Аср	ΔСmax соотв. ΔАmax мкг/кг	$\frac{\Delta C_{max} \cdot 100}{C}$, % (g_2)	Стандартное отклонение I	Отн. станд. отклон. (%)
1	2	3	4	5	6	7	
1	0,05	0,0706	0,0023	0,0872	4,3	0,002	1,914
2		0,0649	0,0033	0,0835			
3		0,0690	0,0008	0,0862			
4		0,0663	0,0020	0,0843			
5		0,0704	0,0021	0,0870			
1	0,2	0,2372	0,0141	0,1973	5,6	0,009	4,337
2		0,2688	0,0174	0,2175			
3		0,2526	0,0012	0,2072			
4		0,2374	0,0140	0,1975			
5		0,2608	0,0094	0,2123			
1	0,5	0,6255	0,0097	0,4427	2,3	0,008	1,888
2		0,5978	0,0179	0,4248			
3		0,6099	0,0059	0,4328			
4		0,6155	0,0002	0,4365			

5		0,6301	0,0143	0,4457			
1	2	2,8659	0,1189	1,8782	3,9	0,073	3,742
2		3,0665	0,0816	2,0070			
3		3,1071	0,1222	2,0328			
4		3,0222	0,0373	1,9783			
5		2,8627	0,1222	1,8763			
1	5	7,6013	4,6164	4,9127	3,5	0,143	2,852
2		7,9515	4,9667	5,1372			
3		8,0295	5,0446	5,1873			
4		7,7876	4,8028	5,0322			
5		7,5037	4,5188	4,8503			

Градуировочная характеристика, выражающая линейную (с угловым коэффициентом) зависимость площадей хроматографических пиков от концентрации 3-МХПД в растворе, построена в диапазоне 0,05 – 5 мкг/мл.

Формула зависимости соотношений площадей хроматографических пиков анализируемого вещества и внутреннего стандарта (S) от соотношений их концентраций (C) имеет вид:

$$S=1,300469 \cdot C-0,065400 \quad (r=0,998);$$

$$\Delta C_{\max}=(\Delta S_{\max}+0,065400) / 1,300469.$$

Из таблицы выбирается максимальное значение погрешности:

$$g_2 = \pm 5,6\% \text{ (би-3-МХПД)}.$$

3.1.4. 1,3-дипальмитоил-2-МХПД.

3.1.4.1. Погрешность приготовления растворов.

НСП приготовления растворов аналита с добавлением внутреннего стандарта (g_{np} (ди-2-МХПД)) складывается из погрешностей взвешивания ($g_{1.1}$), измерения объёмов растворов в мерных колбах ($g_{1.2}$) и одноканальными автоматическими пипетками ($g_{1.3}$), а также погрешностей чистоты реактивов ($g_{1.4}$).

3.1.4.1.1. Погрешность взвешивания 1,3-дипальмитоил-2-МХПД $g_{1.1}$ определяется погрешностью аналитических весов. Взвешивание навески массой 0,01 г на весах 1-го класса точности (специальный) по ГОСТ Р 53228-2008 с погрешностью 0,0001 г приводит к погрешности взвешивания:

$$g_{1.1} = \pm 1,0 \%$$

3.1.4.1.2. НСП измерения объёма раствора 1,3-дипальмитоил-2-МХПД в мерной колбе вместимостью 100 см³ (2-го класса точности) с погрешностью 0,2 см³ (ГОСТ 1770-74) составляет:

$$g_{1.2.1} = \pm 0,2 \%$$

НСП измерения объёма раствора внутреннего стандарта 1,3-дипальмитоил-2-МХПД-d5 в мерной колбе вместимостью 25 см³ (2-го класса точности) с погрешностью 0,08 см³ (ГОСТ 1770-74) составляет (процедура повторяется 2 раза):

$$g_{1.2.2} = \pm \sqrt{2 \cdot (0,08)^2} = \pm 0,11 \%$$

3.1.4.1.3. НСП измерения объёма раствора 1,3-дипальмитоил-2-МХПД автоматическими пипетками на 100-1000 мм³ и 500-5000 мм³ (2-го класса точности), а также измерения объёма внутреннего стандарта 1,3-дипальмитоил-2-МХПД-d5 пипеткой на 20-200 мм³ (2-го класса точности). Выбирается максимальная погрешность, обусловленная отбором 100 мм³ раствора внутреннего стандарта с применением пипетки вместимостью 20-200 мм³, с погрешностью 2,0 %; 500, 100 и 600 мм³ раствора 1,3-дипальмитоил-2-МХПД и 1000 мм³ растворителя с применением пипетки вместимостью 100-1000 мм³, с погрешностями по 1,0 %, а также отбором 6400 мм³ раствора 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5 и 9500 и 9900 мм³ растворителя с применением пипетки вместимостью 500-5000 мм³, с погрешностями по 1,0 %:

$$g_{1.3} = \pm \sqrt{(2,0)^2 + 9 \cdot (1,0)^2} = \pm 3,61 \%$$

3.1.4.1.4. НСП чистоты реактивов $g_{1.4}$ определяется содержанием основного вещества в составе 1,3-дипальмитоил-2-МХПД – 98% и внутреннего стандарта 1,3-дипальмитоил-2-МХПД-d5 – 98%, а также изотопной чистоты последнего – 97,4%:

$$g_{1.4.1} = 2 \%$$

$$g_{1.4.2} = 2 \%$$

$$g_{1.4.3} = 2,6 \%$$

Погрешность приготовления растворов для расчёта содержания 1,3-дипальмитоил-2-МХПД g_{np} ($du-2-МХПД$) составляет:

$$g_{np} (du-2-МХПД) = \pm \sqrt{g_{1.1}^2 + g_{1.2.1}^2 + g_{1.2.2}^2 + g_{1.3}^2 + g_{1.4.1}^2 + g_{1.4.2}^2 + g_{1.4.3}^2} = 5,37 \%$$

3.1.4.2. Погрешность прибора g_n (жидкостного хроматографа с масс-детектором) определяется по экспериментальным данным с применением градуировочных растворов и соответствует относительному среднему квадратичному отклонению выходного сигнала (таблица 1). Выбирается максимальное значение погрешности:

$$g_n = \pm 2,41 \%$$

3.1.4.3. Погрешность построения градуировочных графиков (g_2) рассчитана, исходя из экспериментальных данных в 5-ти точках при проведении 5-ти измерений в каждой точке для анализируемого вещества (таблица 4):

Таблица 4. Данные для построения и метрологической оценки градуировочной характеристики (в качестве показателя отклика прибора использовалось соотношение площадей пика аналита к площади пика внутреннего стандарта).

Номер опыта	Концентрация би-2-МХПД в пробе, С, мкг/мл	Площадь пика, A_i , I-сек	$\Delta A / A = A_i - A_{сп}$, I-сек	ΔS_{max} соотв. ΔA_{max} мкг/кг	$\frac{\Delta S_{max} \cdot 100}{C}$, % (ϱ_2)	Стандартное отклонение I	Отн. станд. отклон. (%)
1	2	3	4	5	6	7	
1	0,05	0,0329	0,0005	0,0788	1,6	0,001	0,699
2		0,0321	0,0003	0,0775			
3		0,0323	0,0002	0,0778			
4		0,0328	0,0003	0,0783			
5		0,0321	0,0003	0,0777			
1	0,2	0,1307	0,0031	0,2105	2,1	0,003	1,511
2		0,1285	0,0009	0,2075			
3		0,1268	0,0008	0,2052			
4		0,1244	0,0032	0,2020			
5		0,1275	0,0001	0,2062			
1	0,5	0,3192	0,0085	0,4645	2,3	0,007	1,567
2		0,3056	0,0051	0,4460			
3		0,3072	0,0035	0,4485			
4		0,3106	0,0001	0,4528			
5		0,3109	0,0002	0,4533			
1	2	1,4130	0,0148	1,9385	2,7	0,047	2,409
2		1,3946	0,0331	1,9138			
3		1,4003	0,0274	1,9215			
4		1,4622	0,0345	2,0048			
5		1,4685	0,0408	2,0132			
1	5	3,7841	2,3564	5,1340	3,6	0,114	2,281
2		3,5543	2,1904	4,8243			
3		3,7056	2,2779	5,0282			
4		3,7202	2,2924	5,0478			
5		3,6723	2,2446	4,9835			

Градуировочная характеристика, выражающая линейную (с угловым коэффициентом) зависимость площадей хроматографических пиков от концентрации би-2-МХПД в растворе, построена в диапазоне 0,05 – 5 мкг/мл.

Формула зависимости соотношений площадей хроматографических пиков анализируемого вещества и внутреннего стандарта (S) от соотношений их концентраций (C) имеет вид:

$$S=0,618353 \cdot C-0,025453 \quad (r=0,999);$$

$$\Delta C_{max}=(\Delta S_{max}+0,025453) / 0,618353.$$

Из таблицы выбирается максимальное значение погрешности:

$$\varrho_2 = \pm 3,6\% \text{ (би-2-МХПД)}.$$

3.1.5. Погрешность измерения ($\mathcal{G}_{\text{изм}}$) складывается из: погрешности, связанной с взвешиванием образца или измерения объёма ($\mathcal{G}_{\text{обр}}$), неполнотой извлечения (экстракции) (\mathcal{G}_3), погрешности измерения объёма раствора пробы (\mathcal{G}_a), погрешности измерения аналитических сигналов ($\mathcal{G}_{\text{сигн}}$).

3.1.5.1. НСП, обусловленная погрешностью измерения массы или объёма пробы:

Погрешность взвешивания пробы $\mathcal{G}_{\text{обр}}$ определяется погрешностью лабораторных весов. Взвешивание навески массой 0,1 г на весах 1-го класса точности (специальный) по ГОСТ Р 53228-2008 с погрешностью 0,0001 г, приводит к погрешности:

$$\mathcal{G}_{\text{обр}} = \pm 0,1 \%$$

3.1.5.2. НСП, обусловленная дозированием объёма внутреннего стандарта

3.1.5.2.1. НСП дозирования внутреннего стандарта 3-МХПД-d5 включает в себя погрешности чистоты реактива, приготовления растворов в мерных колбах и измерения объёмов растворов одноканальными автоматическими пипетками. Погрешность химической чистоты $\mathcal{G}_{1.4.2}$ (3-МХПД-d5) составила 3,0 %, изотопной чистоты $\mathcal{G}_{1.4.3} = 2,3 \%$ (п. 3.1.1.1.3.).

Погрешность приготовления раствора состоит из погрешности измерения объёма раствора 3-МХПД-d5 в мерной колбе вместимостью 50 см³ ($\mathcal{G}_{1.2.2}$, п. 3.1.1.1.2.) и погрешности дозирования 2500 мм³ этого раствора пипеткой на 500-5000 мм³ (п. 3.1.1.1.3.)

$$\mathcal{G}_{3\text{-МХПД-d5}} = \pm \sqrt{(0,17)^2 + (1,0)^2} = \pm 1,01 \%$$

НСП измерения объёма обусловлена отбором 50 мм³ раствора внутреннего стандарта 3-МХПД-d5 дозатором на 20-200 мм³ (2-го класса точности) с погрешностью 2,0 %.

$$\mathcal{G}_{\text{об}} = \pm 2,0 \%$$

Погрешность дозирования внутреннего стандарта 3-МХПД-d5 составляет:

$$\mathcal{G}_{\text{доз}} = \pm \sqrt{\mathcal{G}_{1.4.2}^2 + \mathcal{G}_{1.4.3}^2 + \mathcal{G}_{3\text{-МХПД-d5}}^2 + \mathcal{G}_{\text{об}}^2} = \pm 4,40 \%$$

3.1.5.2.2. НСП дозирования внутреннего стандарта 3-МБПД-d5 включает в себя погрешности чистоты реактива, приготовления растворов в мерных колбах и измерения объёмов растворов в одноканальными автоматическими пипетками. Погрешность химической чистоты $\mathcal{G}_{1.5.2}$ (3-МБПД-d5) составила 3,0 %, изотопной чистоты $\mathcal{G}_{1.5.3} = 1,6 \%$ (п. 3.1.2.1.5.)

Погрешность приготовления раствора состоит из погрешности измерения объёма раствора 3-МБПД-d5 в мерной колбе вместимостью 50 см³ ($\mathcal{G}_{1.2.2}$, п. 3.1.2.1.2.) и измерения

25 см³ мерным цилиндром вместимостью 25 см³ (ГОСТ 1770-74) этого раствора ($\mathcal{G}_{1.4}$, п. 3.1.2.1.4.)

$$\mathcal{G}_{3\text{-МБПД-d5}} = \pm \sqrt{(0,17)^2 + (0,5)^2} = \pm 0,52 \%$$

НСП измерения объёма обусловлена отбором 50 мм³ раствора внутреннего стандарта 3-МБПД-d5 дозатором на 20-200 мм³ (2-го класса точности) с погрешностью 2,0 %.

$$\mathcal{G}_{об} = \pm 2,0 \%$$

Погрешность дозирования внутреннего стандарта 3-МБПД-d5 составляет:

$$\mathcal{G}_{доз} = \pm \sqrt{\mathcal{G}_{1.5.2}^2 + \mathcal{G}_{1.6.3}^2 + \mathcal{G}_{3\text{-МБПД-d5}}^2 + \mathcal{G}_{об}^2} = \pm 3,98 \%$$

3.1.5.2.3. НСП дозирования внутреннего стандарта 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5 включает в себя погрешности чистоты реактива, приготовления растворов в мерных колбах и измерения объёмов растворов одноканальными автоматическими пипетками. Погрешность химической чистоты $\mathcal{G}_{1.3.2}$ 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5 составила 2 %, изотопной чистоты $\mathcal{G}_{1.3.3} = 2 \%$ (п. 3.1.3.1.3.)

Погрешность приготовления раствора состоит из погрешности измерения объёма раствора 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5 в мерной колбе вместимостью 25 см³ ($\mathcal{G}_{1.1.2}$, п. 3.1.3.1.1.) и погрешности дозирования 6400 мм³ этого раствора пипеткой на 500-5000 мм³ (п. 3.1.3.1.2.)

$$\mathcal{G}_{6и-3\text{-МХПД-d5}} = \pm \sqrt{(0,11)^2 + (1,0)^2} = \pm 1,01 \%$$

НСП измерения объёма обусловлена отбором 100 мм³ раствора внутреннего стандарта 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5 дозатором на 20-200 мм³ (2-го класса точности) с погрешностью 2,0 %.

$$\mathcal{G}_{об} = \pm 2,0 \%$$

Погрешность дозирования внутреннего стандарта 1,2-дипальмитоил-3-МХПД-d5 составляет:

$$\mathcal{G}_{доз} = \pm \sqrt{\mathcal{G}_{1.3.2}^2 + \mathcal{G}_{1.3.3}^2 + \mathcal{G}_{6и-3\text{-МХПД-d5}}^2 + \mathcal{G}_{об}^2} = \pm 3,61 \%$$

3.1.5.2.4. НСП дозирования внутреннего стандарта 1,3-дипальмитоил-2-МХПД включает в себя погрешности чистоты реактива, приготовления растворов в мерных колбах и измерения объёмов растворов в одноканальными автоматическими пипетками. Погрешность химической чистоты $\mathcal{G}_{1.4.2}$ 1,3-дипальмитоил-2-МХПД составила 2 %, изотопной чистоты $\mathcal{G}_{1.4.3} = 2,6 \%$ (п. 3.1.4.1.4.)

Погрешность приготовления раствора состоит из погрешности измерения объёма раствора 1,3-дипальмитоил-2-МХПД в мерной колбе вместимостью 25 см³ ($\mathcal{G}_{1.2.2}$, п.

3.1.4.1.2.) и погрешности дозирования 6400 мм^3 этого раствора пипеткой на $500-5000 \text{ мм}^3$ (п. 3.1.4.1.3.)

$$\mathcal{G}_{\text{би-2-МХПД-d5}} = \pm \sqrt{(0,11)^2 + (1,0)^2} = \pm 1,01 \%$$

НСП измерения объёма обусловлена отбором 100 мм^3 раствора внутреннего стандарта 1,3-дипальмитоил-2-МХПД дозатором на $20-200 \text{ мм}^3$ (2-го класса точности) с погрешностью $2,0 \%$.

$$\mathcal{G}_{\text{об}} = \pm 2,0 \%$$

Погрешность дозирования внутреннего стандарта 1,3-дипальмитоил-2-МХПД составляет:

$$\mathcal{G}_{\text{доз}} = \pm \sqrt{\mathcal{G}_{1.4.2}^2 + \mathcal{G}_{1.4.3}^2 + \mathcal{G}_{\text{би-2-МХПД-d5}}^2 + \mathcal{G}_{\text{об}}^2} = \pm 3,97 \%$$

3.1.5.3 Погрешность измерения аналитических сигналов ($\mathcal{G}_{\text{сигн}}$) - площади пика, соответствует относительному среднему квадратичному отклонению выходного сигнала хроматографа (таблица 1):

$$\mathcal{G}_{\text{сигн}} = \pm 6,73 \% \text{ (3-МХПД);}$$

$$\mathcal{G}_{\text{сигн}} = \pm 4,64 \% \text{ (глицидол в пробе А);}$$

$$\mathcal{G}_{\text{сигн}} = \pm 4,34 \% \text{ (би-3-мхпд);}$$

$$\mathcal{G}_{\text{сигн}} = \pm 2,41 \% \text{ (би-2-мхпд).}$$

Систематическую погрешность измерения концентраций ($\mathcal{G}_{\text{изм}}$) рассчитывают по формуле:

$$\mathcal{G}_{\text{изм}} = \pm \sqrt{\mathcal{G}_{\text{э}}^2 + \mathcal{G}_{\text{сигн}}^2 + \mathcal{G}_{\text{обр}}^2 + \mathcal{G}_{\text{вн.ст.}}^2};$$

$$\mathcal{G}_{\text{изм}} = 9,23\% \text{ (би-3-МХПД);}$$

$$\mathcal{G}_{\text{изм}} = 6,40\% \text{ (би-2-МХПД).}$$

Поскольку расчёт содержания глицидола в образце проводится по результатам определения 3-МХПД, глицидола в пробе А и би-3-МХПД:

$$\mathcal{G}_{\text{изм}} = \pm \sqrt{\mathcal{G}_{\text{э}}^2 + \mathcal{G}_{\text{сигн (3-МХПД)}}^2 + \mathcal{G}_{\text{обр (проба А)}}^2 + \mathcal{G}_{\text{вн.ст.(3-МХПД)}}^2 + \mathcal{G}_{\text{сигн (глицидол в пробе А)}}^2 + \mathcal{G}_{\text{обр (глицидол в пробе А)}}^2 + \mathcal{G}_{\text{вн.ст.(глицидол в пробе А)}}^2 + \mathcal{G}_{\text{вн.ст.(3-МБПД)}}^2 + \mathcal{G}_{\text{изм (би-3-МХПД)}}^2} = \pm 18,50\%$$

3.1.6. Суммарная систематическая погрешность с учётом неисключённой систематической погрешности при доверительной вероятности $P=0,95$ и $k = 1,1$ определяется по формуле:

$$\delta_{\text{с}} = \pm 1,1 \sqrt{\mathcal{G}_{\text{пр}}^2 + \mathcal{G}_{\text{э}}^2 + \mathcal{G}_{\text{н}}^2 + \mathcal{G}_{\text{изм}}^2}$$

$$\delta_{\text{с}} = 17,94 \text{ (би-3-МХПД);}$$

$\delta_c = 10,35$ (би-2-МХПД);

$\delta_c = 30,19$ (глицидол).

3.2. Определение случайной составляющей погрешности измерения концентраций.

Погрешность определяется на основании 5 параллельных измерений при внесении определенного количества вещества в образец в 4-х точках по диапазону определяемых концентраций.

3.2.1. 3-МХПД (рассчитывается по результатам в пробе Б).

Таблица 5. Данные по метрологической оценке методики (5 повторностей для каждой концентрации, $P=0,95$)

<i>N</i> <i>опы-</i> <i>та</i>	<i>Внесено 3-</i> <i>МХПД,</i> <i>мкг/г</i>	<i>Найдено</i> <i>3-МХПД,</i> <i>мкг/г (%)</i>	<i>Ср,</i> <i>мкг/г (%)</i>	<i>Стандартное</i> <i>отклонение, σ,</i> <i>мкг/г</i>	<i>Относитель-</i> <i>ное станд.</i> <i>отклон., %</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
1	0,3	0,3671 (122,4)	0,31 (102,7)	0,049	15,892
2		0,3401 (113,4)			
3		0,2386 (79,5)			
4		0,2944 (98,1)			
5		0,3001 (100,0)			
1	5,0	5,9373 (118,7)	5,8950 (117,9)	0,089	1,507
2		5,9199 (118,4)			
3		5,9338 (118,7)			
4		5,7370 (114,7)			
5		5,9468 (118,9)			
1	30,0	35,376 (117,9)	36,096 (120,3)	1,202	3,330
2		37,830 (126,1)			
3		35,959 (119,9)			
4		34,695 (115,7)			
5		36,618 (122,1)			

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение для всего диапазона измерений составляют соответственно – 113,6% и 12,1%.

Среднее квадратичное (стандартное) отклонение повторяемости- σ_r , устанавливаются, принимая равным $S_{r,m}$, рассчитываемому по формуле:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^M [(S_{ml})^2 / M]}{M}}$$

$$\sigma_r = S_{r,m}$$

$$\sigma_r = 9,4\%$$

Предел повторяемости (r), рассчитываемый по формуле $r = 2,8 \sigma_r$, равен:

$$r = 26\%$$

Таблица 5а. Данные по метрологической оценке методики (в лабораториях по 5 повторностей для каждой концентрации, P= 0,95)

<i>N</i> <i>опы-</i> <i>та</i>	<i>Внесено 3-</i> <i>МХПД,</i> <i>мкг/г</i>	<i>Найдено</i> <i>3-МХПД,</i> <i>мкг/г (%)</i>	<i>Сср,</i> <i>мкг/г (%)</i>	<i>Стандартное</i> <i>отклонение, σ,</i> <i>мкг/г</i>	<i>Относитель-</i> <i>ное станд.</i> <i>отклон., %</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
1	0,3	0,367 (122,4)	0,32 (105,1)	0,034	10,676
2		0,340 (113,4)			
3		0,239 (79,5)			
4		0,294 (98,1)			
5		0,300 (100,0)			
6		0,318 (106,0)			
7		0,328 (109,3)			
8		0,326 (108,7)			
9		0,323 (107,7)			
10		0,317 (105,7)			
1	3,0	3,562 (118,7)	3,178 (105,9)	0,380	11,966
2		3,552 (118,4)			
3		3,560 (118,7)			
4		3,442 (114,7)			
5		3,568 (118,9)			
6		2,800 (93,3)			
7		2,824 (94,1)			
8		2,833 (94,4)			
9		2,814 (93,8)			
10		2,823 (94,1)			
1	30,0	35,376 (117,9)	33,234 (110,8)	3,141	9,452
2		37,830 (126,1)			
3		35,959 (119,9)			
4		34,695 (115,7)			
5		36,618 (122,1)			
6		30,182 (100,6)			
7		31,182 (103,9)			
8		29,696 (99,0)			
9		30,494 (101,6)			
10		30,312 (101,0)			

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение для всего диапазона измерений составляют соответственно – 107,3% и 11,4%.

Среднее квадратичное (стандартное) отклонение воспроизводимости- σ_R рассчитывают по формуле:

$$S_R = \sqrt{\sum_{m=1}^M [(S_{ml})^2 / M]}$$

$$\sigma_R = S_{R,m}$$

$$\sigma_R = 10,7\%$$

Предел воспроизводимости (R), рассчитываемый по формуле $R = 2,8 \cdot \sigma_R$, равен:

R = 30%

3.2.2. 2-МХПД (рассчитывается по результатам в пробе Б).

Таблица 6. Данные по метрологической оценке методики (5 повторностей для каждой концентрации, P= 0,95)

<i>N</i> <i>опы-</i> <i>та</i>	<i>Внесено 2-</i> <i>МХПД,</i> <i>мкг/г</i>	<i>Найдено</i> <i>2-МХПД,</i> <i>мкг/г (%)</i>	<i>Ср,</i> <i>мкг/г (%)</i>	<i>Стандартное</i> <i>отклонение, σ,</i> <i>мкг/г</i>	<i>Относитель-</i> <i>ное станд.</i> <i>отклон., %</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
1	0,3	0,3818 (127,3)	0,3046 (101,5)	0,045	14,788
2		0,3037 (101,2)			
3		0,2719 (90,6)			
4		0,2912 (97,1)			
5		0,2745 (91,5)			
1	5,0	5,2685 (105,4)	5,254 (105,1)	0,266	5,071
2		5,1395 (102,8)			
3		5,3503 (107,0)			
4		4,8937 (97,9)			
5		5,6166 (112,3)			
1	30,0	36,649 (122,2)	35,092 (117,0)	1,085	3,093
2		34,896 (116,3)			
3		35,292 (117,6)			
4		33,607 (112,0)			
5		35,018 (116,7)			

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение для всего диапазона измерений составляют соответственно – 107,9% и 11,1%.

Среднее квадратичное (стандартное) отклонение повторяемости- σ_r , устанавливают, принимая равным $S_{r,m}$, рассчитываемому по формуле:

$$S_r = \sqrt{\sum_{m=1}^M [(S_{ml})^2 / M]}$$

$$\sigma_r = S_{r,m}$$

$$\sigma_r = 9,2\%$$

Предел повторяемости (r), рассчитываемый по формуле $r = 2,8 \sigma_r$, равен:

$$r = 26\%$$

Таблица 6а. Данные по метрологической оценке методики (в 2 лабораториях по 5 повторностей для каждой концентрации, P= 0,95)

<i>N</i> <i>опы-</i> <i>та</i>	<i>Внесено 2-</i> <i>МХПД,</i> <i>мкг/г</i>	<i>Найдено</i> <i>2-МХПД,</i> <i>мкг/г (%)</i>	<i>Ср,</i> <i>мкг/г (%)</i>	<i>Стандартное</i> <i>отклонение, σ,</i> <i>мкг/г</i>	<i>Относитель-</i> <i>ное станд.</i> <i>отклон., %</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
1	0,3	0,382 (127,3)	0,3117 (103,9)	0,0311	9,964
2		0,304 (101,2)			
3		0,272 (90,6)			
4		0,291 (97,1)			
5		0,275 (91,5)			

6		0,316 (105,3)			
7		0,315 (105,0)			
8		0,320 (106,7)			
9		0,325 (108,3)			
10		0,318 (106,0)			
1	3,0	3,161 (105,4)	3,008 (100,3)	0,191	6,352
2		3,084 (102,8)			
3		3,210 (107,0)			
4		2,936 (97,9)			
5		3,370 (112,3)			
6		2,821 (94,0)			
7		2,976 (99,2)			
8		2,817 (93,9)			
9		2,831 (94,4)			
10		2,872 (95,7)			
1	30,0	36,649 (122,2)	32,690 (109,0)	2,665	8,153
2		34,896 (116,3)			
3		35,292 (117,6)			
4		33,607 (112,0)			
5		35,018 (116,7)			
6		30,163 (100,5)			
7		31,298 (104,3)			
8		30,152 (100,5)			
9		29,613 (98,7)			
10		30,214 (100,7)			

Среднее квадратичное (стандартное) отклонение воспроизводимости- σ_R
рассчитывают по формуле:

$$S_{R,m} = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^M [(S_{ml})^2 / M]}{M}}$$

$$\sigma_R = S_{R,m}$$

$$\sigma_R = 8,3\%$$

Предел воспроизводимости (R), рассчитываемый по формуле $R = 2,8 \cdot \sigma_R$, равен:

$$R = 23\%$$

3.2.3. Глицидол (рассчитывается по результатам определения 3-МХПД и глицидола в пробе А и 3-МХПД в пробе Б).

Таблица 7. Данные по метрологической оценке методики (5 повторностей для каждой концентрации, $P=0,95$)

<i>N</i> опы- та	<i>Внесено</i> глицидола, мкг/г	<i>Найдено</i> глицидола, мкг/г (%)	<i>Сср,</i> мкг/г (%)	<i>Стандартное</i> отклонение, σ , мкг/г	<i>Относитель-</i> <i>ное станд.</i> <i>отклон., %</i>
1	2	4	4	5	6
1	0,3	0,2274 (75,8)	0,2140 (71,3)	0,0050	14,923
2		0,2147 (71,6)			
3		0,1827 (60,9)			
4		0,1853 (61,8)			

5		0,2598 (86,6)			
1	5,0	4,1077 (82,2)	4,1930 (83,9)	0,0091	2,183
2		4,1712 (83,4)			
3		4,2405 (84,8)			
4		4,1184 (82,4)			
5		4,3270 (86,5)			
1	30,0	32,805 (109,3)	32,227 (107,4)	0,2863	5,332
2		31,214 (104,0)			
3		32,437 (108,1)			
4		30,062 (100,2)			
5		34,618 (115,4)			

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение для всего диапазона измерений составляют соответственно – 87,5% и 16,81%.

Среднее квадратичное (стандартное) отклонение повторяемости- σ_r устанавливаются, принимая равным $S_{r,m}$, рассчитываемому по формуле:

$$S_r = \sqrt{\sum_{m=1}^M [(S_{ml})^2 / M]}$$

$$\sigma_r = S_{r,m}$$

$$\sigma_r = 9,2\%$$

Предел повторяемости (r), рассчитываемый по формуле $r = 2,8 \sigma_r$, равен:

$$r = 26\%$$

Таблица 7а. Данные по метрологической оценке методики (в лабораториях по 5 повторностей для каждой концентрации, P= 0,95)

<i>N</i> <i>опы-</i> <i>та</i>	<i>Внесено</i> <i>глицидола,</i> <i>мкг/г</i>	<i>Найдено</i> <i>глицидола,</i> <i>мкг/г (%)</i>	<i>Сср,</i> <i>мкг/г (%)</i>	<i>Стандартное</i> <i>отклонение, σ,</i> <i>мкг/г</i>	<i>Относитель-</i> <i>ное станд.</i> <i>отклон., %</i>
1	2	4	4	5	6
1	0,3	0,2274 (75,8)	0,2867 (95,6)	0,080	27,982
2		0,2147 (71,6)			
3		0,1827 (60,9)			
4		0,1853 (61,8)			
5		0,2598 (86,6)			
6		0,337 (112,3)			
7		0,375 (125,0)			
8		0,362 (120,7)			
9		0,372 (124,0)			
10		0,351 (117,0)			
1	3,0	2,465 (82,2)	2,559 (85,3)	0,060	2,338
2		2,503 (83,4)			
3		2,544 (84,8)			
4		2,471 (82,4)			
5		2,596 (86,5)			
6		2,577 (85,9)			
7		2,599 (86,6)			
8		2,591 (86,4)			

9		2,626 (87,5)			
10		2,617 (87,2)			
1	30,0	32,805 (109,3)	31,225 (104,1)	1,608	5,151
2		31,214 (104,0)			
3		32,437 (108,1)			
4		30,062 (100,2)			
5		34,618 (115,4)			
6		30,373 (101,2)			
7		30,908 (103,0)			
8		29,291 (97,6)			
9		30,104 (100,3)			
10		30,435 (101,5)			

Среднее квадратичное (стандартное) отклонение воспроизводимости- σ_R
рассчитывают по формуле:

$$S_{R,m} = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^M [(S_{ml})^2 / M]}{M}}$$

$$\sigma_R = S_{R,m}$$

$$\sigma_R = 16,5\%$$

Предел воспроизводимости (R), рассчитываемый по формуле $R = 2,8 \cdot \sigma_R$, равен:

$$R = 46\%$$

3.3. Определение суммарной погрешности методики (показатель точности).

$$S_{\text{сум}}^2 = \delta_c^2 + \sigma_R^2$$

$\delta_c = 17,94$ (п. 3.1.6) (3-МХПД (по результатам в пробе Б));

$\sigma_R = 10,7\%$ (3.2.1) (3-МХПД (по результатам в пробе Б));

$S_{\text{сум}}^2 = 436,3$ (3-МХПД (по результатам в пробе Б));

$\delta = \pm 40,94$ (~ 41%) (3-МХПД (по результатам в пробе Б));

$\delta_c = 10,35$ (п. 3.1.6) (2-МХПД (по результатам в пробе Б));

$\sigma_R = 8,3\%$ (3.2.2) (2-МХПД (по результатам в пробе Б));

$S_{\text{сум}}^2 = 176,0$ (2-МХПД (по результатам в пробе Б));

$\delta = \pm 26,00$ (~ 26%) (2-МХПД (по результатам в пробе Б));

$\delta_c = 30,19$ (п. 3.1.6) (глицидол итоговый);

$\sigma_R = 16,5\%$ (3.2.3) (глицидол итоговый);

$S_{\text{сум}}^2 = 1183,4$ (глицидол итоговый);

$\delta = \pm 67,43$ (~ 67%) (глицидол итоговый).

Таблица 8. Метрологические параметры. Значения характеристики погрешности, нормативов оперативного контроля точности, повторяемости, воспроизводимости

Анализируемый объект	Диапазон определяемого содержания, мг/кг		Характеристика погрешности, $\pm\delta$, %, $P=0,95$	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r , %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), R , % ($P=0,95$)	Средняя полнота извлечения вещества, %
	Нижний	Верхний						
3-МХПД	0,3	30,0	41	9,4	10,7	26	30	107,3
2-МХПД	0,3	30,0	26	9,2	8,3	26	23	104,4
Глицидол	0,3	30,0	67	9,2	16,5	26	46	95,0

Вывод: методика определения (измерения) 3-МХПД, 2-МХПД и глицидола методом газожидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим анализом удовлетворяет требованиям ГОСТ Р 8.563-2009.

Ответственный исполнитель:

Руководитель лаборатории химии пищевых продуктов

Бессонов В.В.

Исполнители:

Научный сотрудник

Малинкин А.Д.

Младший научный сотрудник

Макаренко М.А.

Приложение Г. ИК-спектры подсолнечных масел.

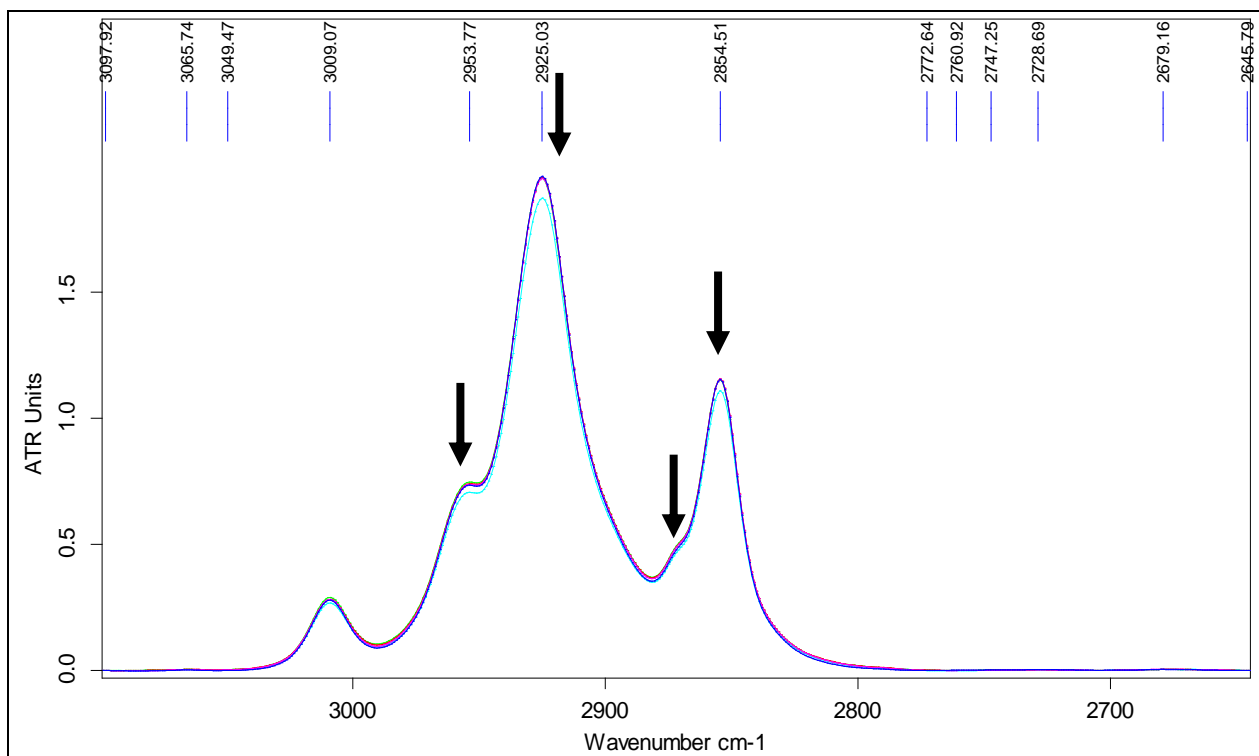


Рис. 3.4.2 А

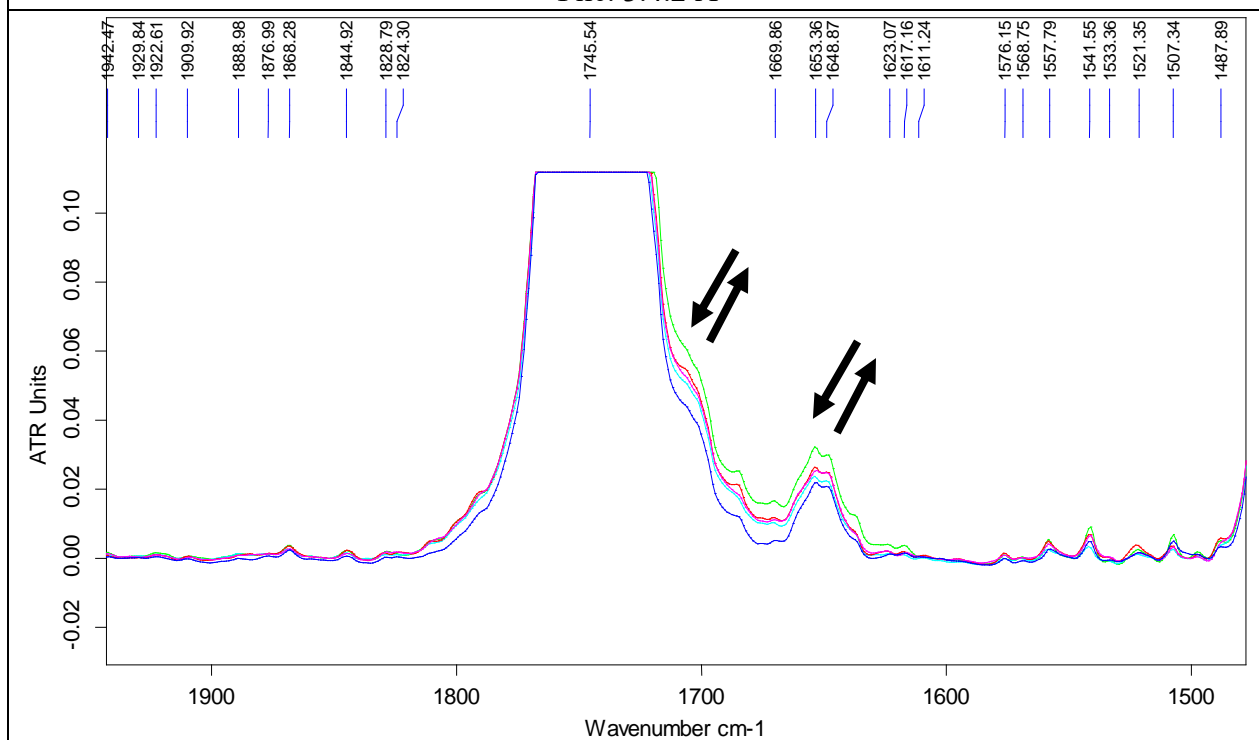
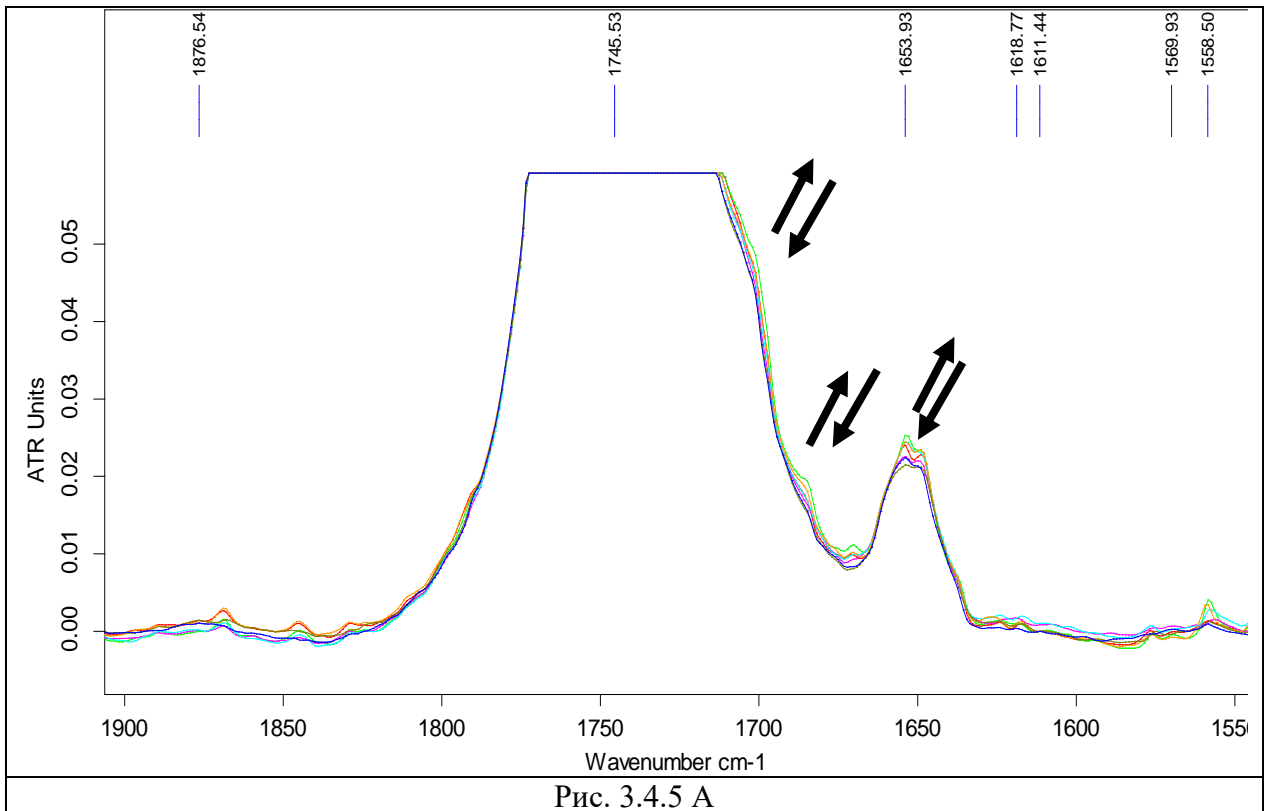
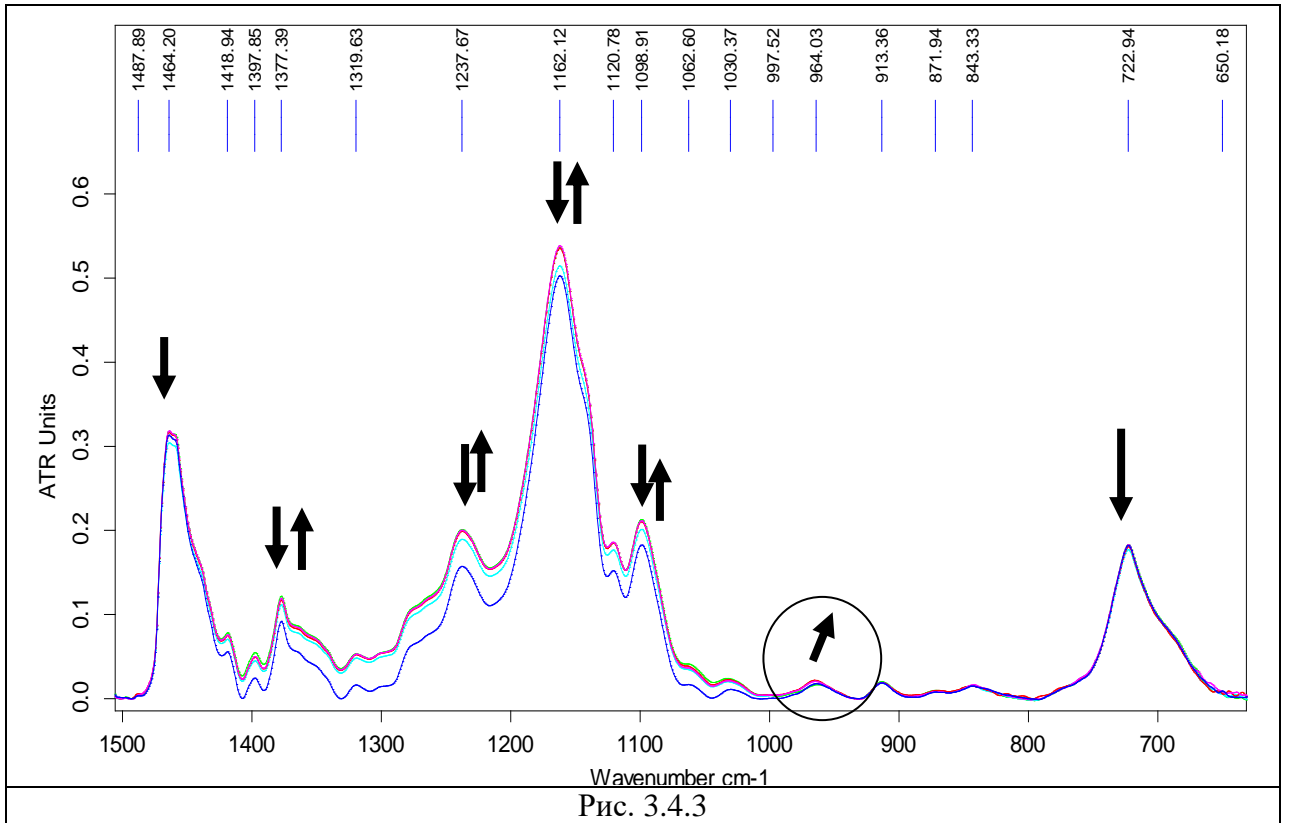
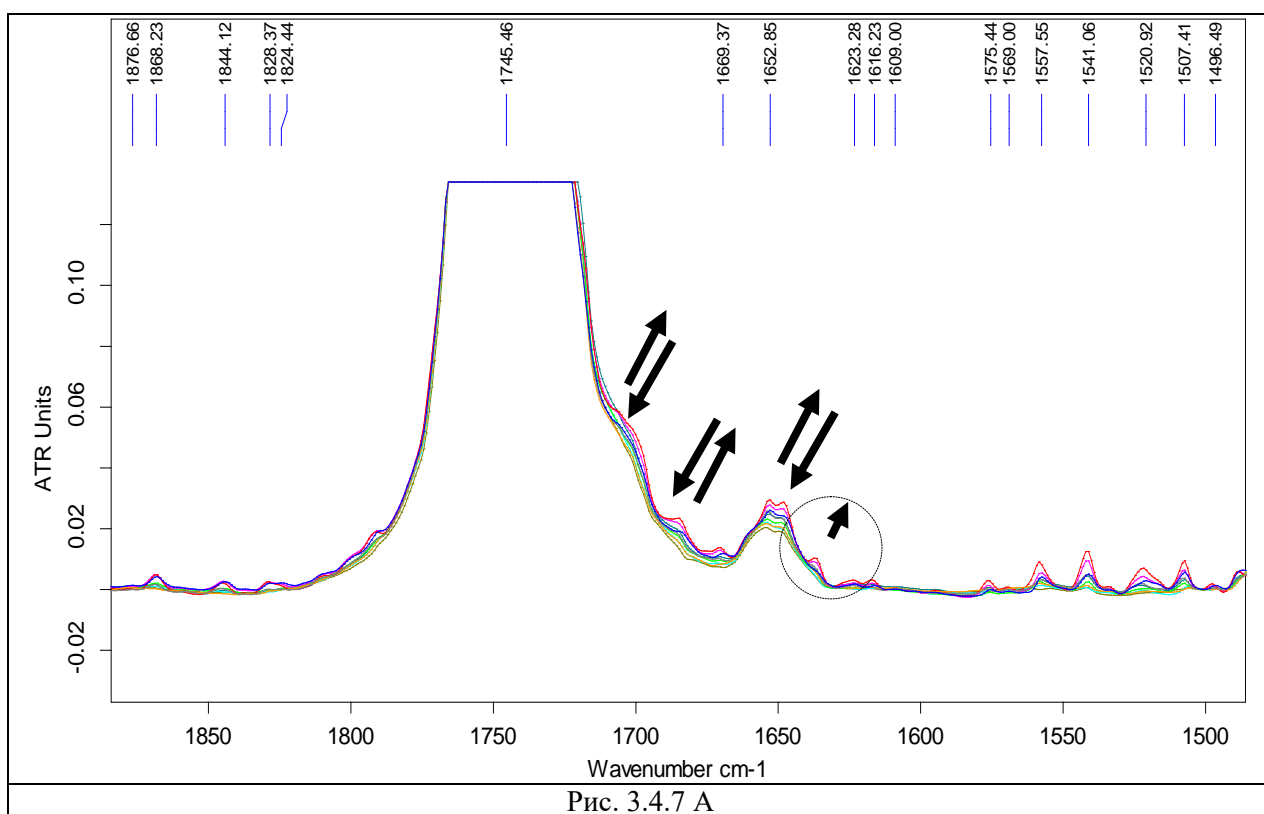
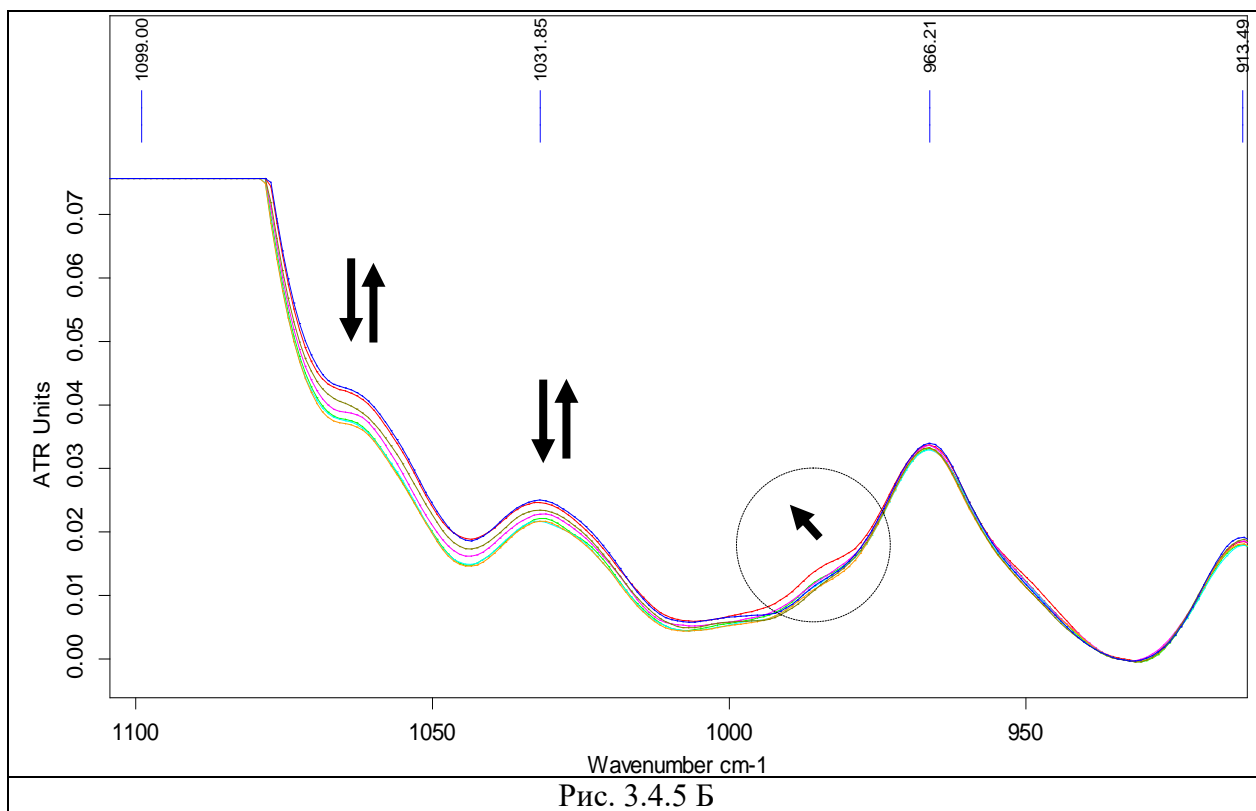
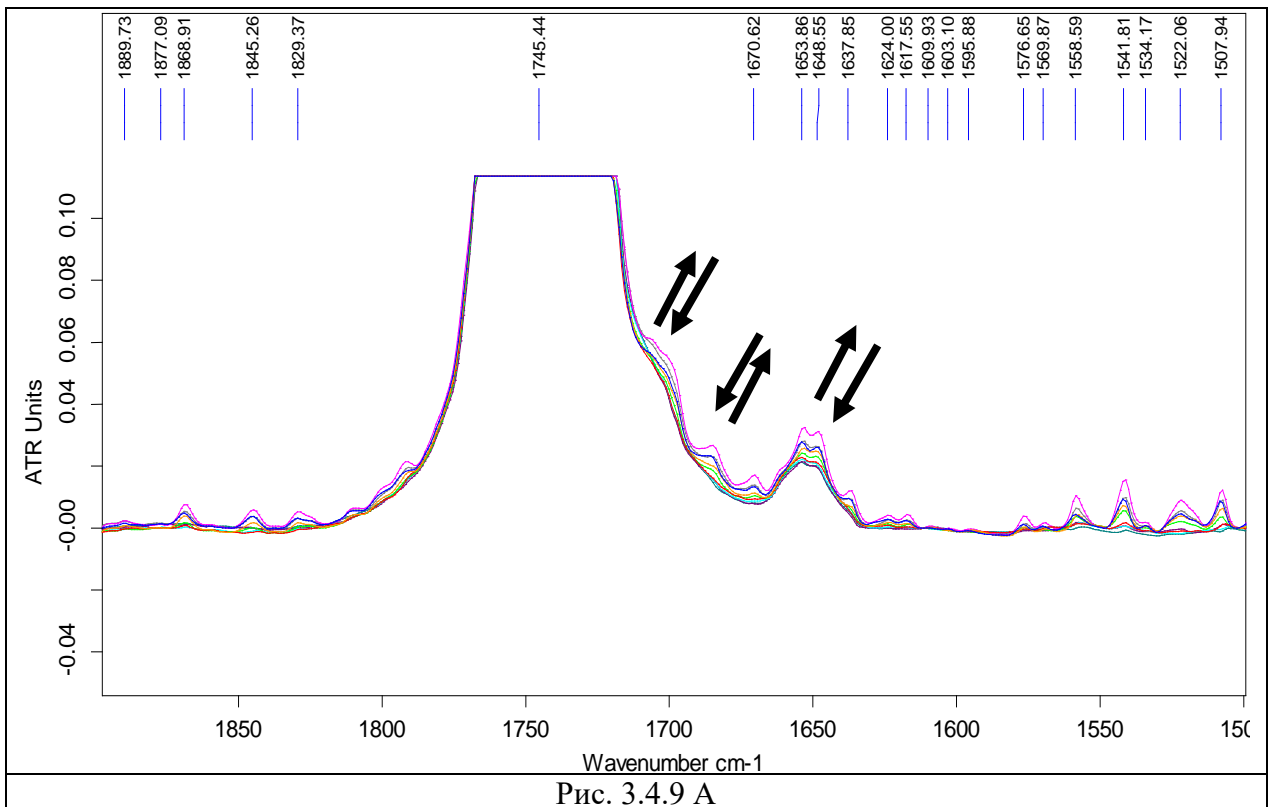
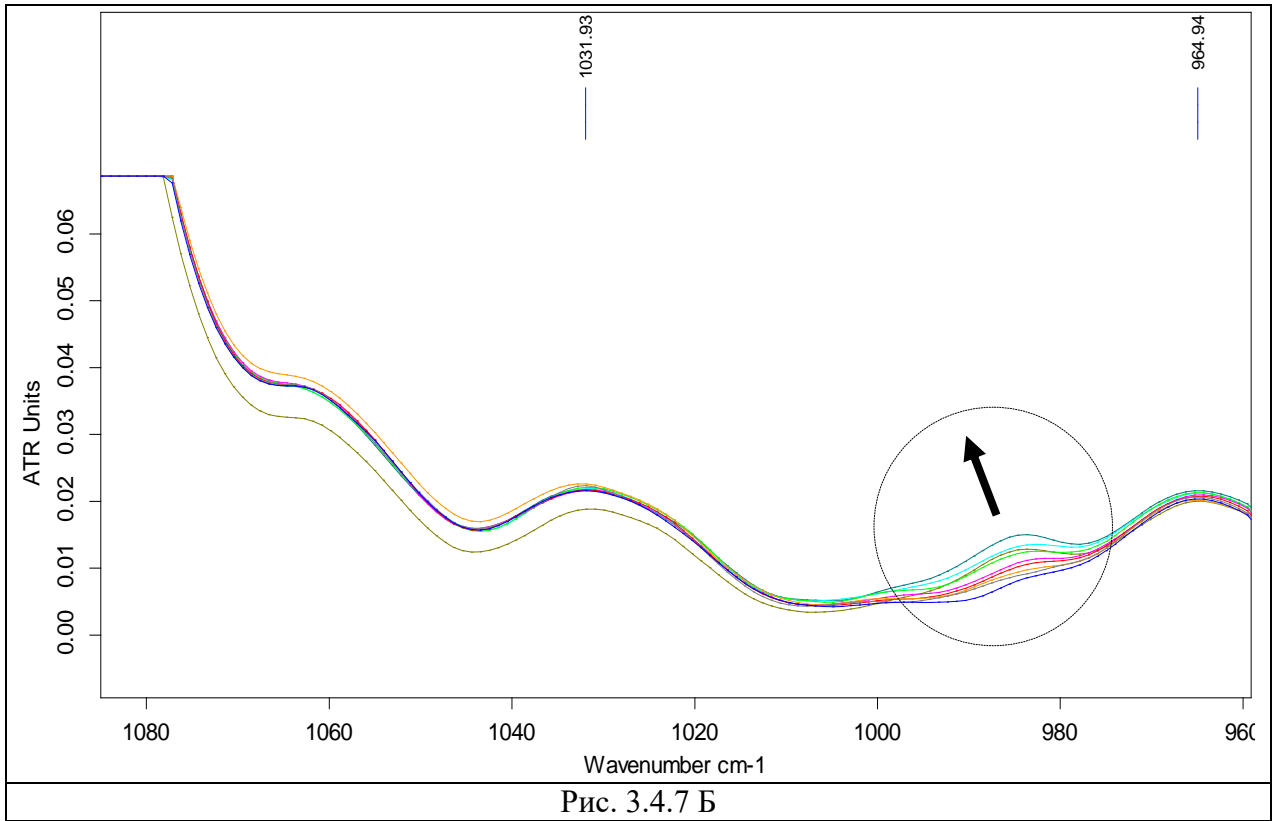
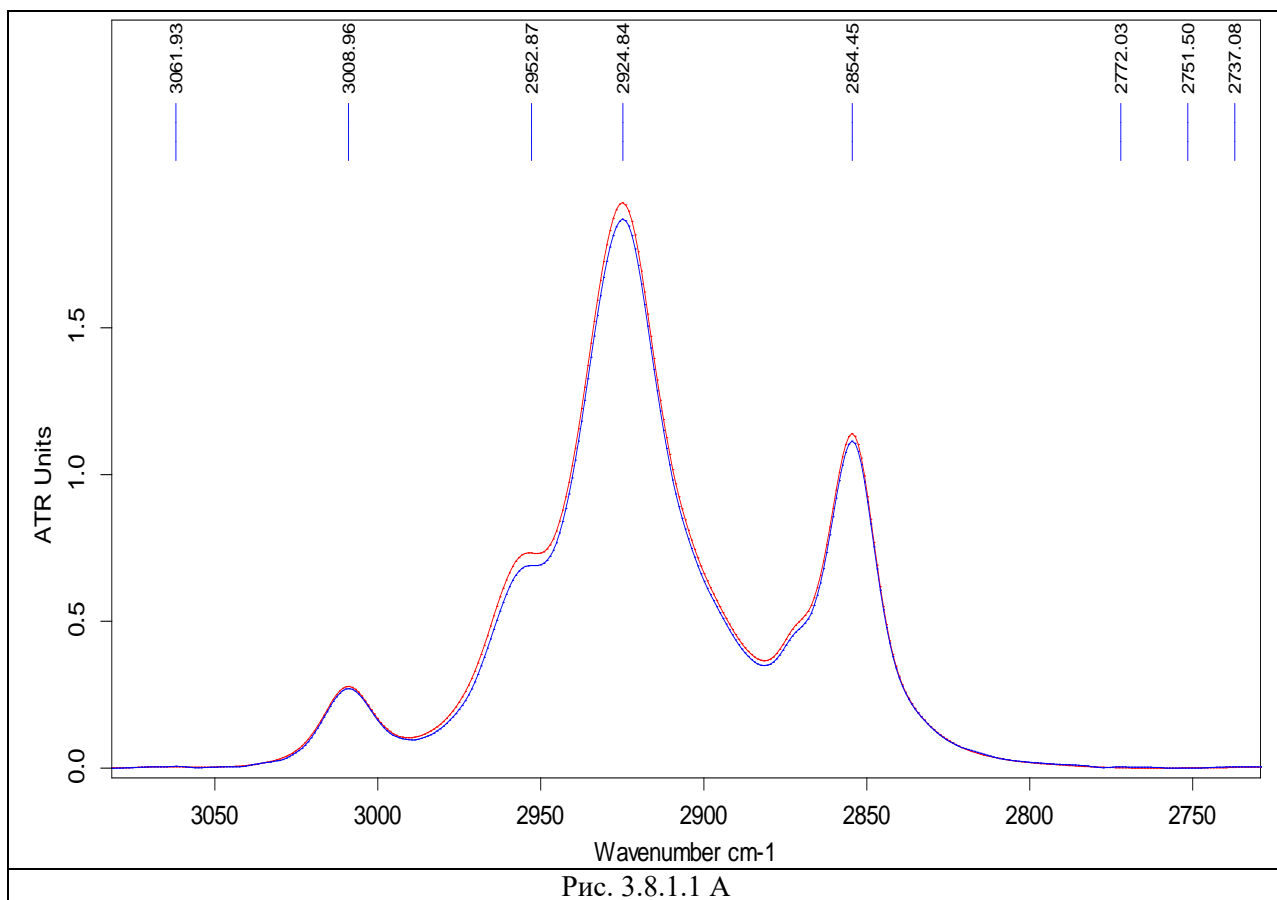
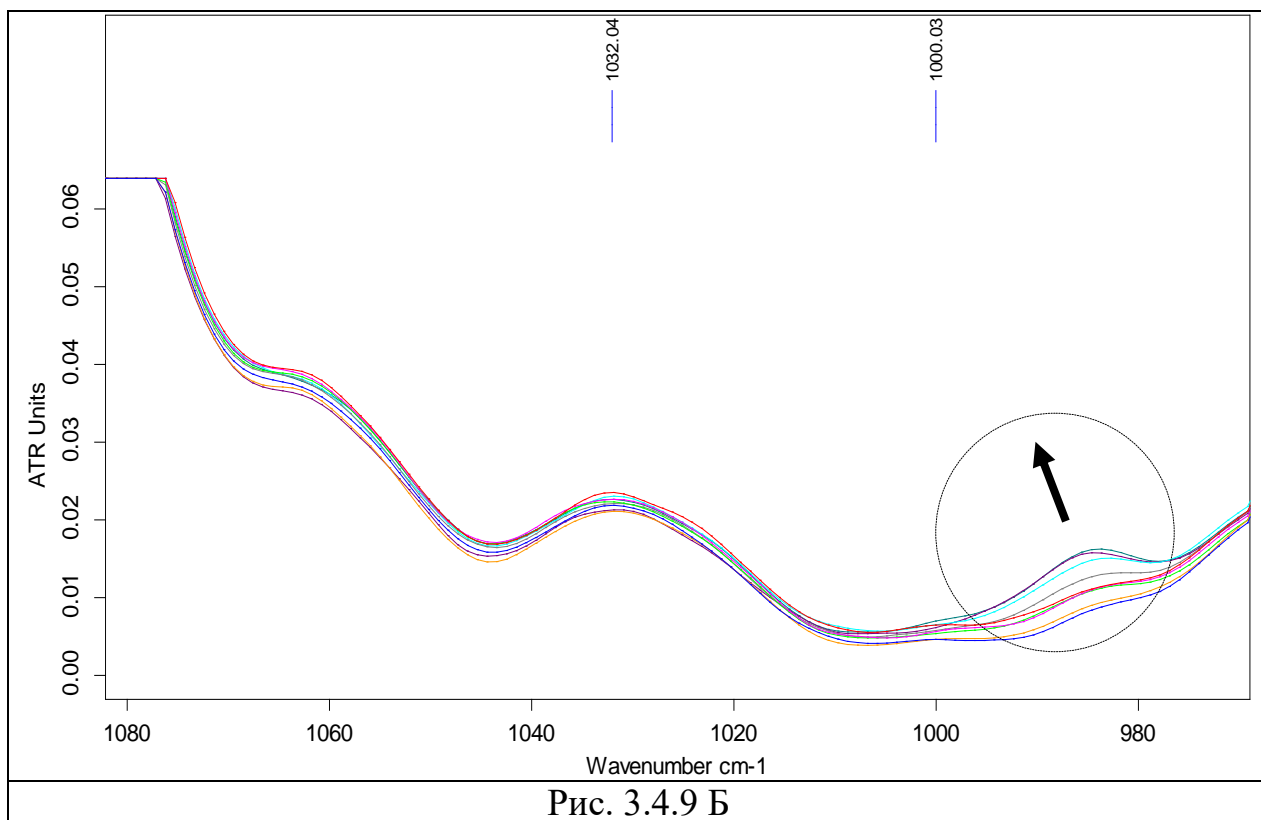


Рис. 3.4.2 Б









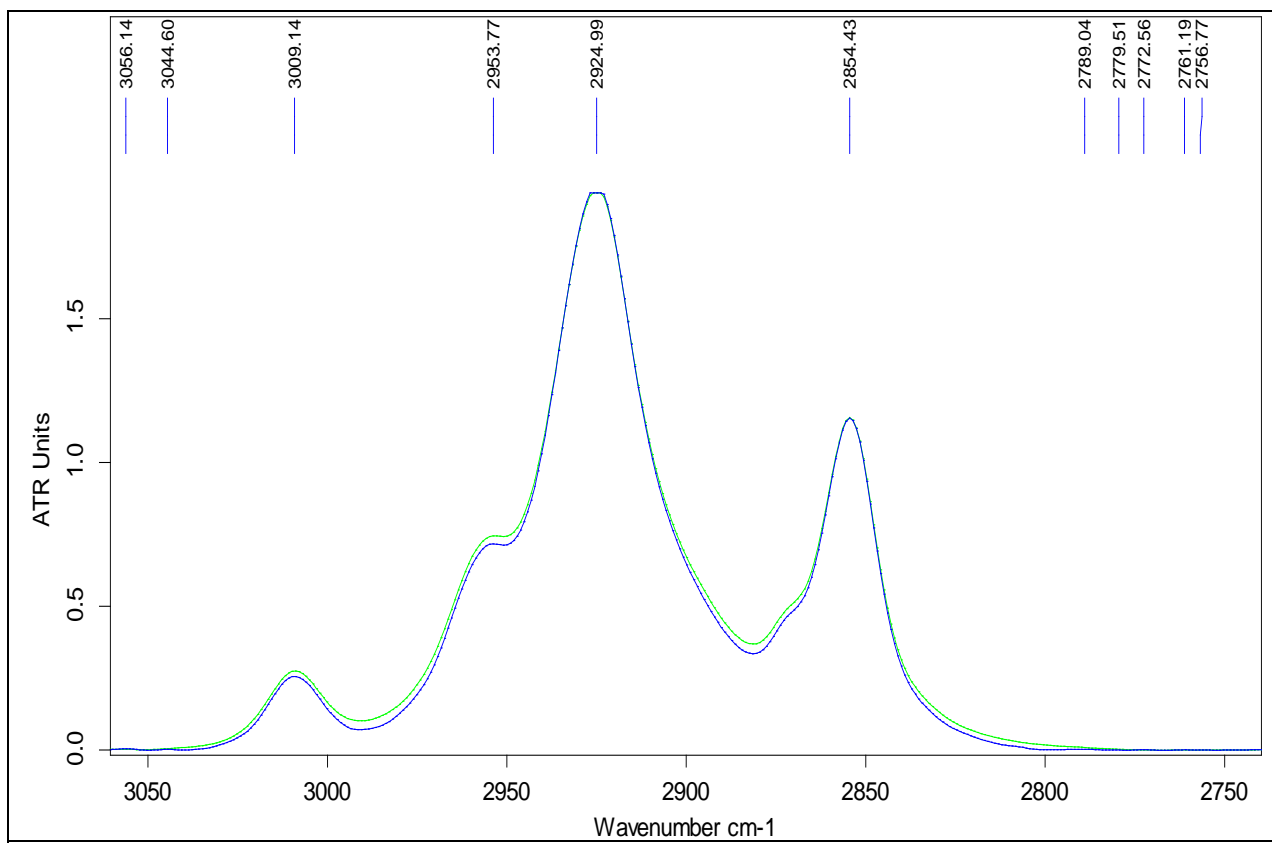


Рис. 3.8.1.1 Б

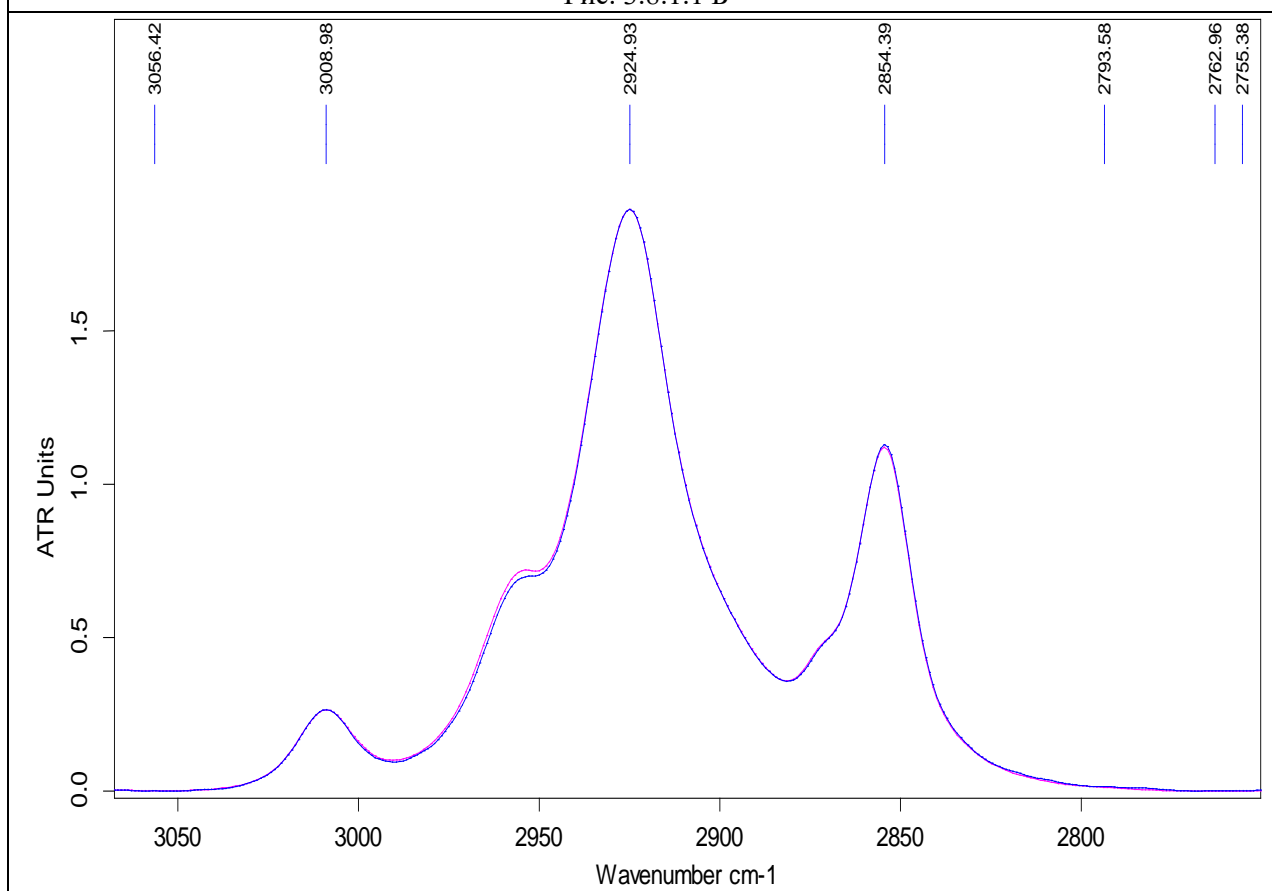


Рис. 3.8.1.1 Б

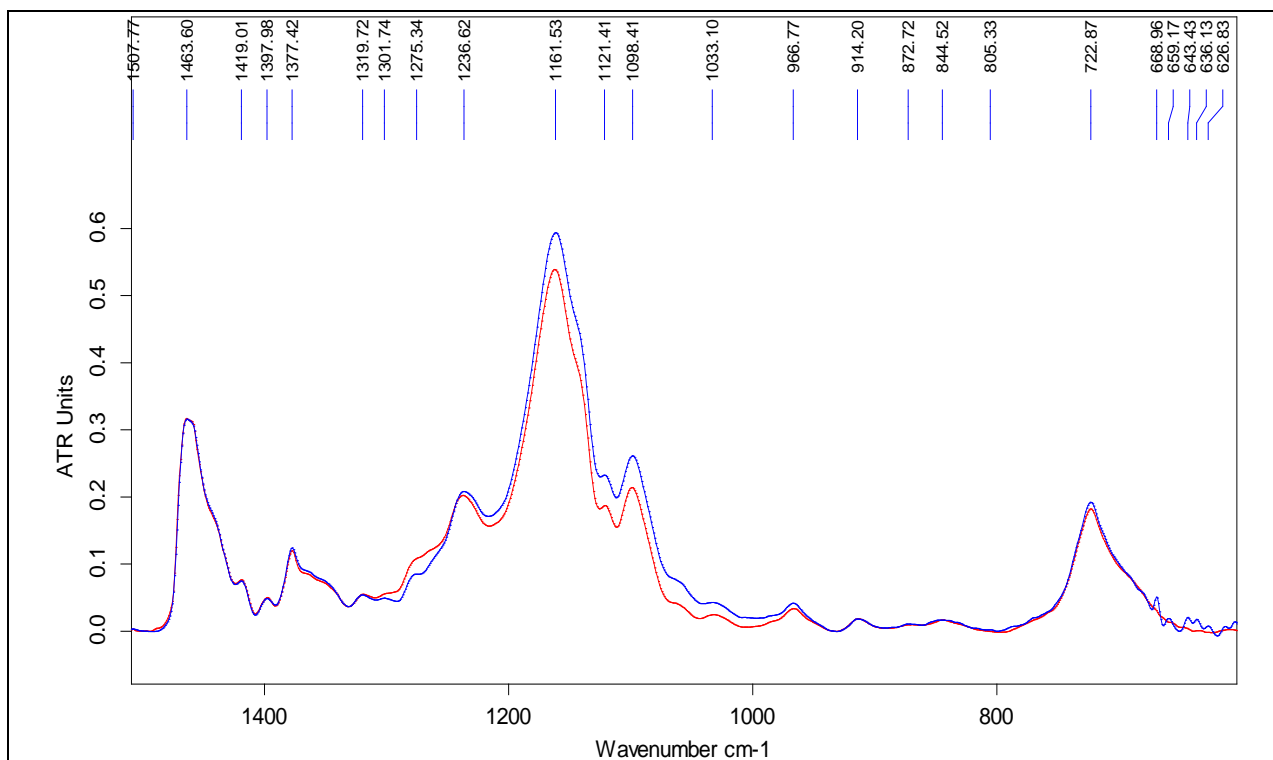


Рис. 3.8.1.2 А

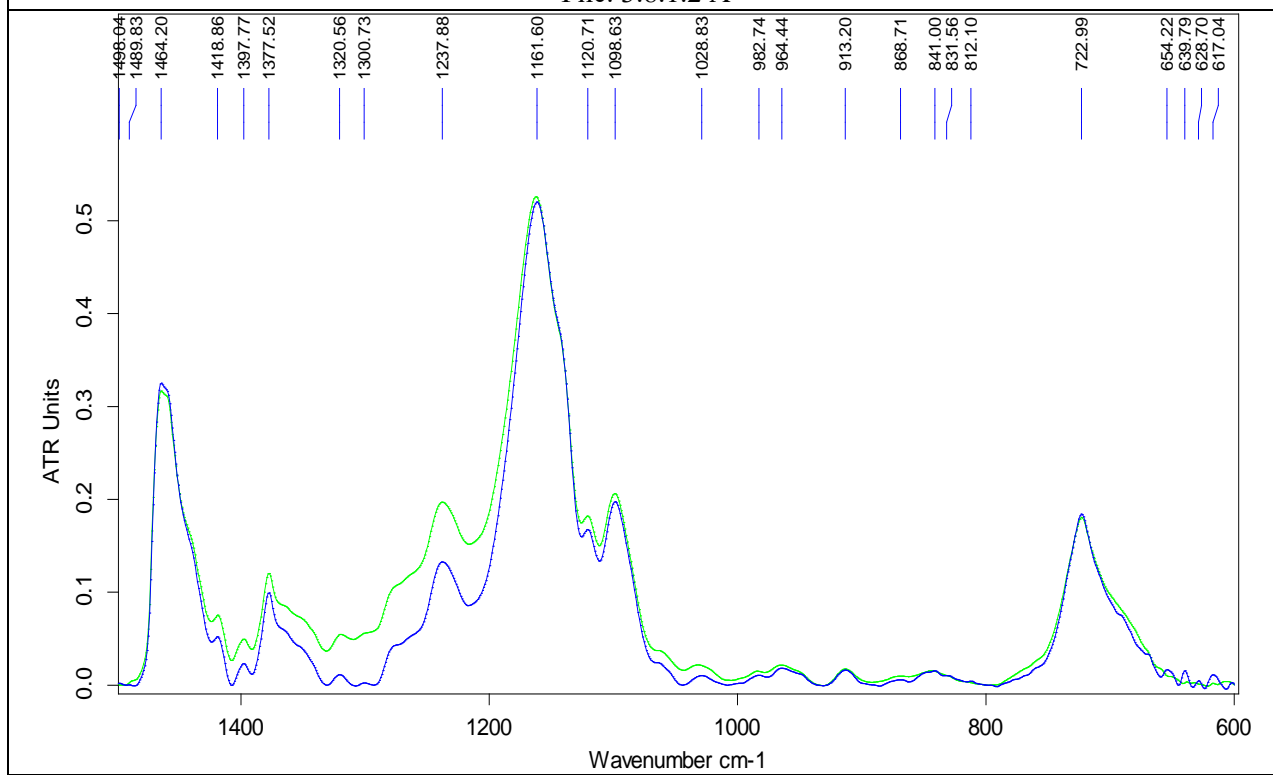


Рис. 3.8.1.2 Б

