

Опыт применения газовой хроматомасс-спектрометрии в сочетании с твердофазной микроэкстракцией для исследования состава летучих органических соединений в матрицах с высоким содержанием жиров

***Е.И. Савельева, Е.Д. Кессених, Л.К. Густылева**

*НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека,
Российская Федерация, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г/п Кузьмоловский*

**Адрес для переписки: Савельева Елена Игоревна, E-mail: niigrech@rihophe.ru*

Поступила в редакцию 1 апреля 2019 г., после исправления – 30 декабря 2019 г.

В работе представлен методический подход для сравнительного исследования компонентного состава летучих органических соединений (ЛОС) в матрицах, основу которых составляют жирные кислоты: натуральном продукте и ароматизаторе, идентичном натуральному. Идентификацию летучих органических соединений проводили методом газовой хроматомасс-спектрометрии без использования образцов сравнения на основании масс-спектров электронной ионизации и линейных индексов удерживания. На первом этапе методом компьютерного библиотечного поиска устанавливали соединение с максимальным фактором совпадения по масс-спектру. На втором этапе проверяли результат идентификации путем сопоставления экспериментальных и справочных величин индексов удерживания. Справочные величины индексов удерживания подбирали с учетом идентичности экспериментальных условий (неподвижная фаза колонки, режим программирования температуры). Показано, что в ацетонитрильном экстракте ароматизатора идентифицировать ароматобразующие соединения не представляется возможным ввиду их перекрывания пиками ди- три-глицеридов жирных кислот. Улавливание из паровой фазы и концентрирование летучих соединений проводили методом твердофазной микроэкстракции. В составе ароматизатора идентифицировано 39 летучих компонентов, в том числе растворители пропиленгликоль и триацетин, присутствие которых является главным отличием искусственного ароматизатора от натурального продукта. В натуральном масле какао также идентифицировано 39 летучих веществ. Все они являются характерными компонентами для ферментированных какао-бобов. Группа алкилпиразинов, характерных для аромата какао, в натуральном продукте представлена семью компонентами: 2,3-диметилпиразин, 2,5-диметилпиразин, этилпиразин, 2-метил-6-этилпиразин, 2,3,5-триметилпиразин; 2,5-диметил-3-этилпиразин; тетраметилпиразин. В количественном отношении в натуральном масле какао преобладают изомерные 2,3-бутандиолы, суммарно составляющие 37 % от общего содержания ЛОС в паровой фазе. Используемая техника анализа может быть распространена на другие объекты сложного, в том числе и гетерогенного, состава.

Ключевые слова: газовая хроматомасс-спектрометрия, твердофазная микроэкстракция из газовой фазы, масс-спектры, индексы удерживания, ароматизаторы

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2020, vol. 24, no. 1, pp. 21-30

DOI: 10.15826/analitika.2020.24.1.003

Experience with the application of gas chromatography-mass spectrometry in combination with solid-phase microextraction for the study of the composition of volatile organic compounds in matrices with the high fat content

***E. Savelieva E. Kessenikh, L. Gustyleva**

*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology,
g/p Kiz'molovskii, Vsevolozhskii raion, Leningradskaia oblast', 188663, Russian Federation*

*Corresponding author: Elena I. Savelieva, E-mail: niigpech@rihophe.ru

Submitted 01 April 2019, received in revised form 30 December 2019

Current article presents a methodological approach for a comparative study of the composition of volatile organic compounds (VOCs) in a natural product and a nature-identical flavoring substance. The identification of VOCs was performed by gas chromatography-mass spectrometry without reference compounds. The identification was made based on coincidence of the experimental and reference mass spectra and linear retention indices. During the first step, the closest match factor substance was selected based on the library search. During the second step, the result was verified by the means of experimental and reference retention indices data proximity. The reference retention indices were selected considering the identity of the experimental conditions (chromatographic stationary phase, temperature programming mode). The impossibility of identification of aroma components in acetonitrile extract of fragrance was shown due to the overlapping of their peaks with peaks of di- and tri- glycerides of fatty acids. The extraction and concentration of VOCs from vapor were carried out using the head space solid-phase microextraction. The fragrance content investigation revealed 39 volatile organic compounds including propylene glycol and triacetin as the markers of synthetic fragrances. In natural cocoa butter, also 39 volatile organic compounds were identified. All of them were common for the fermented cocoa beans. Pyrazines derivatives, characteristic of cocoa aroma, were presented with the following 7 components: 2,3-dimethylpyrazine; 2,5-dimethylpyrazine; ethylpyrazine; 2-methyl-6-ethylpyrazine; 2,3,5-trimethylpyrazine, 2,5-dimethyl-3-ethylpyrazine; tetramethylpyrazine. In quantitative terms, the isomeric 2,3-butandiolis predominate in the head space of natural cocoa butter accounting for 37 percent of total VOC content. The analytical technique used allows investigation of multicomponent objects including the heterogeneous ones.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry, head space solid-phase microextraction, mass spectra, retention indices, fragrance.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что теория и практика метода твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) были разработаны еще в конце прошлого века [1], в отечественных лабораториях до настоящего времени он не нашел широкого распространения. В качестве примеров успешного применения метода ТФМЭ отечественными лабораториями можно привести определение летучих углеводов в почве [2], аттестованную методику определения летучих экотоксикантов в цельной крови [3], исследование профилей летучих метаболитов микроскопических грибов [4], определение метаболитов токсичных веществ в биопробах [5]. В ряду основных преимуществ метода обычно упоминают его простоту, экспрессность и экологическую безопасность. Отказ от использования органических растворителей не только экологически целесообразен, но и снимает проблему перекрытия летучих органических соединений пиком растворителя. При отборе пробы на микроволокно из равновесного пара можно анализировать объекты любой природы: твердые, жидкие, гетерогенные, можно также проводить мониторинг профилей летучих метаболитов живых систем в условиях *in vivo* [6, 7]. Анализ паровой фазы с применением ТФМЭ является методом выбора при определении ЛОС в различных затрудненных для анализа матрицах, содержащих воск, жир и имеющих гетерогенный состав [8]. Определение ЛОС в составе твердых, жидких и эмульгированных жиров не регулируется стандартизованными методами анализа, в то же время методическое решение этой задачи актуально для контроля ка-

чества многих товаров широкого потребления, в том числе и пищевых продуктов.

Контроль качества пищевых продуктов является неотъемлемой частью комплексной программы обеспечения химической безопасности. Установление подлинности и идентичности продукции из природного сырья относится к наиболее сложным задачам химического анализа, поскольку стандартизация такой продукции по набору регламентированных показателей часто не позволяет отличить высококачественный натуральный продукт от имитации [9]. Уникальный аромат является важнейшим свойством, обуславливающим потребительскую ценность продукции, изготавливаемой из природного сырья [10]. Именно по составу ЛОС часто устанавливают подлинность таких пищевых продуктов как мед, сыры, вина, пиво, ореховые пасты, чай, кофе, шоколад [8, 10-16].

В последние годы в торговой сети позиционируется серия «натуральные продукты», в рамках которой предлагается продукция с гарантированным отсутствием искусственных ингредиентов. Определение красителей, загустителей, эмульгаторов, консервантов и прочих примесей в пищевых продуктах регулируется утвержденными методиками и в целом является налаженным процессом. Установление наличия в продукции ароматизаторов не регулируется стандартными процедурами и представляет трудность, как в части исполнения анализа, так и в части интерпретации его результатов. Согласно введенной в действие в 2009 г. и действующей до настоящего времени директиве ЕС [17], термин «натуральные» может быть применен только к тем ароматическим веществам, которые получены в результате физических, ферментативных или микробиологических процессов из сырья растительного, животного или

микробного происхождения. Другими словами, натуральный аромат формируется исключительно из компонентов биосинтетического происхождения, которые, как правило, претерпевают трансформацию в процессе ферментации и другой переработки.

Наиболее часто встречающаяся фальсификация заключается в замене природной смеси ароматобразующих соединений ароматизатором, который, в отличие природного комплекса, является искусственной смесью химических соединений различного происхождения (как натурального, так и синтетического). Кроме того, распространенной практикой является усиление аромата натурального продукта добавлением в него индивидуальных ароматобразующих веществ синтетического происхождения. В полной мере это относится к продукции, изготавливаемой из какао-бобов. Даже опытные дегустаторы не всегда способны выявить различия в ароматизированном и натуральном какао, а также продукции на его основе – шоколаде, шоколадном масле и др. Органолептически активные натуральные компоненты шоколада образуются в процессе ферментации, сушки и дальнейшей переработки какао-бобов. Предшественниками ароматических веществ являются аминокислоты, пептиды, редуцирующие сахара [18-19]. В процессе обжарки какао-бобов происходят химические реакции, в результате которых образуются компоненты аромата какао: спирты, эфиры, пирролы, триазолы, оксазолы, триазины, амины, имины и др. [20]. Различные комбинации синтетических аналогов этих соединений используются при изготовлении ароматизаторов.

Применение таких дорогостоящих технологий, как изотопная масс-спектрометрия [21-23] в целях установления природного или синтетического происхождения ингредиентов применительно к анализу пищевых продуктов зачастую экономически нецелесообразно и ограничено низкими концентрациями и высокой летучестью ароматических веществ. Разделение оптических изомеров с использованием хиральных колонок для установления происхождения душистых веществ применяется более часто [24, 25].

Имеются примеры успешной расшифровки состава натуральных и искусственных ароматов путем сочетания олфактометрии с хроматографическим анализом, использования многомерной хроматографии, тандемных газовых и жидкостных хроматомасс-спектрометров [26, 27]. Значительно менее затратным, а в ряде случаев и не менее продуктивным подходом к определению природы аромата по-прежнему остается применение газовых хроматографов с квадрупольными масс-детекторами низкого разрешения.

Оптимальным способом расшифровки компонентного состава натуральных и воспроизведенных ароматов является применение газовой хроматомасс-спектрометрии в сочетании с твердофазной микроэкстракцией (**ГХ-МС/ТФМЭ**). Поскольку в доступных базах данных преобладают индексы

удерживания (**ИУ**) ЛОС, полученные в условиях хроматографического разделения на капиллярных колонках с неподвижной слабополярной фазой 5%-дифенил-95%-диметилполисилоксан, при идентификации соединений в отсутствие образцов сравнения предпочтительнее использовать именно такие колонки. При разделении многокомпонентных смесей, как правило, применяют режим программирования температуры, при использовании которого идентификация компонентов проводится по масс-спектрам и параметрам удерживания с применением линейных ИУ [28]. В использованном нами программном обеспечении GCMS Solution также предусмотрен расчет линейных ИУ.

Метод ТФМЭ может быть реализован как в режиме погружения микроволокна в пробу, так и в режиме отбора аналитов на микроволокно из паровой фазы. Отбор ЛОС из паровой фазы позволяет анализировать жидкие, твердые, эмульгированные образцы, и, что особенно важно, продукты с высоким содержанием жиров. Использование данного метода объединяет все этапы пробоподготовки, ведет к снижению временных затрат, исключает использование растворителя, уменьшает стоимость анализа и способствует снижению пределов обнаружения аналитов. В комбинации с ГХ-МС метод ТФМЭ из паровой фазы хорошо зарекомендовал себя в анализе многокомпонентных газовых, жидких и твердых объектов, особенно при экстракции ЛОС из природных или биологических образцов [4-7]. В режиме целевого анализа большим преимуществом ТФМЭ является возможность применения микроволокон, изготовленных с использованием полимеров различной химической природы. Существуют рекомендации по применению тех или иных микроволокон для извлечения/концентрирования ЛОС из различных анализируемых сред [29].

Если аналиты представлены группой априори неизвестных соединений, и основной задачей анализа является их идентификация, условия ТФМЭ (время и температура сорбции/десорбции, выбор микроволокна, соотношение объемов образца и воздушной фазы) подбирают по принципу универсальности. Необходимо сорбировать на микроволокно аналиты с различной полярностью и летучестью в мягких условиях, исключающих их деструкцию/трансформацию в ходе анализа. Исходя из упомянутого выше принципа универсальности, при идентификации неизвестных ЛОС в составе многокомпонентных смесей методом ТФМЭ предпочтительным следует считать микроволокно карбоксен/полидиметилсилоксан [6], способное сорбировать аналиты в наиболее широком диапазоне физико-химических характеристик.

Целью настоящей работы являлось определение ЛОС в составе натурального шоколадного масла и искусственного ароматизатора и установление различий в составе ЛОС этих образцов,

позволяющих отличить натуральный продукт от ароматизированного.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования

Ароматизатор пищевой «масло какао» производства Швейцарии. Масло шоколадное производства России, закупленное в сети магазинов «Натуральные продукты».

Методы исследования

Исследование образцов проводили методом газовой хроматомасс-спектрометрии (ГХ-МС) в режиме ионизации электронами с энергией 70 эВ. Определение ЛОС в паровой фазе над исследуемым образцом проводили методом ТФМЭ. Для установления жирнокислотного состава 200 мг ароматизатора обрабатывали 2х0.5 мл ацетонитрила (ТУ 6-09-5497-91) и отделяли ацетонитрильный слой центрифугированием. Аликвотную часть ацетонитрильного экстракта (2 мкл) вводили в инжектор газового хроматографа.

Оборудование

Газовый хроматомасс-спектрометр GCMS-QP2010 Plus фирмы Shimadzu, оборудованный автоматическим дозатором для ТФМЭ АОС-5000; капиллярная кварцевая колонка HP-5MS – 30м×0,25мм×0,25мм (Part No. 19091S-433) фирмы Agilent Technologies; весы лабораторные электронные AW 220 общего назначения высокого класса точности, производства фирмы Shimadzu; микроволокно с неподвижной фазой Карбоксен/Полидиметилсилоксан с толщиной пленки фазы 85 мкм (Supelco Cat. No 57334-U); виалы для парофазного анализа объемом 20 мл, Supelco SU860098.

Условия ГХ-МС/ТФМЭ анализа

Исследуемую пробу ароматизатора массой 0.1 г или шоколадного масла массой 1 г помещали на дно виалы для парофазного анализа объемом 20 мл. Виалу герметизировали с помощью завинчивающейся магнитной крышки с тефлоновой прокладкой и устанавливали в держатель для виал автодозатора АОС-5000. Термостатирование проб, концентрирование ЛОС на микроволокне, термодесорбцию с волокна в инжекторе хроматографа проводили в автоматическом режиме. Перед анализом исследуемую пробу встряхивали в блоке термостата автодозатора при температуре 70 °С в течение 30 минут. Концентрирование ЛОС из паровой фазы на микроволокне проводили в течение 15 минут при температуре 70 °С, десорбция ЛОС с микроволокна проводилась в инжекторе хроматографа в течение двух минут при 250 °С.

Газохроматографическое разделение: температура испарителя 250 °С; ввод пробы без

деления потока с задержкой сброса 2 мин.; температурная программа: начальная температура колонки 40 °С (2 минуты), подъем температуры до 280 °С со скоростью 10 °С/мин, конечная температура колонки 280 °С, выдержка при конечной температуре 10 минут; газ-носитель гелий, расход газа-носителя через колонку 1,0 мл/мин.

Для расчета индексов удерживания в тех же экспериментальных условиях анализировали смесь нормальных алканов (Supelco Cat. No 500631). Из справочных характеристик ИУ, представленных на сайте NIST Chemistry WebBook [30], выбирали значения, наиболее точно отвечающие использованному экспериментальным условиям (фаза и геометрия колонки, температурная программа).

Масс-спектрометрический анализ: энергия ионизирующих электронов 70 эВ, температура интерфейса 280 °С, температура ионного источника 200 °С, режим регистрации – сканирование по полному ионному току в диапазоне массовых чисел m/z 40-700.

При исследовании жирнокислотной основы ароматизатора в испаритель хроматографа вводили 2 мкл ацетонитрильного экстракта и анализировали методом ГХ-МС как указано выше с той разницей, что выдержка при конечной температуре составляла 30 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ароматизатор «масло какао» представляет классический пример матрицы, наиболее затрудненной для определения ЛОС в ее составе. На рисунке представлена масс-хроматограмма ацетонитрильного экстракта ароматизатора.

Стандартным подходом к ГХ анализу объектов с высоким содержанием жиров является извлечение аналитов в ацетонитрил. Бесперспективность жидкостной экстракции при определении ЛОС в смеси ди- и три- глицеридов жирных кислот иллюстрирует рисунок. Компонент № 1 на хроматограмме – триацетин. Остальные пики соответствуют диглицеридам (№№ 2-5) и триглицеридам (№№ 7-12) жирных кислот: каприловой, пеларгоновой и каприновой. Пики, соответствующие ароматобразующим компонентам, на масс-хроматограмме не обнаруживаются. Концентрирование экстракта привело бы к перегрузке колонки и выходу из строя хроматографической системы. Еще более сложную матрицу представляет собой шоколадное масло. Невозможность преодоления матричного эффекта при использовании жидко-жидкостной экстракции диктует необходимость проведения экстракции/концентрирования ЛОС исключительно из паровой фазы. Этой задаче отвечает ТФМЭ в режиме парофазного анализа.

В табл. 1 приведены результаты идентификации ЛОС в паровой фазе над образцом ароматизатора. Мажорными компонентами паровой фазы над ароматизатором являются 3-метилбутановая кислота

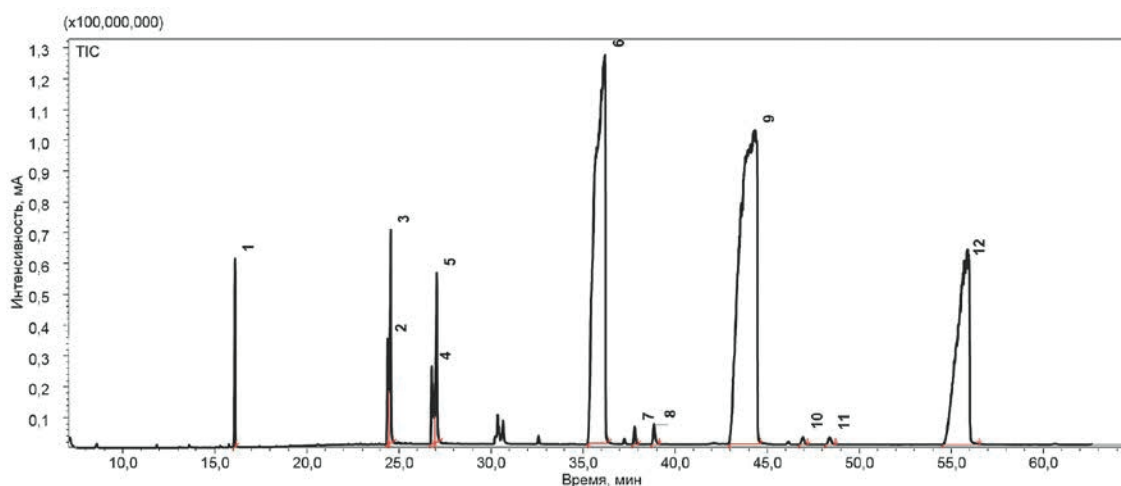


Рис. Хроматограмма ацетонитрильного экстракта из образца ароматизатора: 1 – триацетин; 2 – 12-ди- и триглицериды жирных кислот.

Fig. Chromatogram of acetonitrile extract from the fragrance sample: 1 – triacetin; 2 – 12- di- and tri- glycerides of fatty acids.

Таблица 1

Соединения, идентифицированные в паровой фазе над образцом ароматизатора «масло какао».

Table 1

Substances identified in the head space of “cocoa butter” fragrance

№	Время удерживания, минут	SI*, %	Индекс удерживания ИУ _{эксп} ¹ (ИУ _{лит.})	Оценочное содержание по площадям пиков методом внутренней нормализации, %	Идентифицированный компонент
1	3.67	98	739 (732)	14	Пропиленгликоль
2	4.45	94	790 (789)	0.1	1-Октен
3	4.61	93	800 (806)	0.1	Гексаналь
4	4.64	89	802 (800)	0.04	Этилбутират
5	4.72	93	806 (805)	0.01	2-Октен
6	4.88	96	816 (812)	0.04	Бутилацетат
7	5.39	89	844 (799)	0.06	2-этил, 4-метил-1,3-Диоксолан
8	5.51	92	851 (820)	0.5	Этиловый эфир 2-метилбутановой кислоты
9	5.57	95	854 (852)	0.8	Этиловый эфир 3-метилбутановой кислоты
10	6.82	95	871 (876)	28	3-Метилбутановая (изовалериановая) кислота
11	7.13	89	942 (951)	0.4	2,6-Диметил-4-гептанон
12	7.37	91	956 (951)	0.2	4-Этилоктан
13	7.68	97	973 (957/976)	0.9	Диметилтрисульфид
14	7.84	93	982 (966)	0.02	2,2,6-Триметилоктан
15	8.01	91	992 (995)	0.3	2-этил-1-Гексанол
16	8.11	89	998 (999)	0.09	Гексановая кислота
17	8.16	90	1000 (1000)	0.02	н-Декан
18	8.36	96	1012 (1008)	15	2,3,5-Триметилпиразин
19	8.70	94	1032 (1029)	0.4	Лимонен
20	9.07	-	1055	0.2	Углеводород C ₁₂ H ₂₆
21	9.16	-	1060	0.2	Углеводород C ₁₂ H ₂₆
22	9.30	-	1069	0.2	Углеводород C ₁₂ H ₂₆
23	9.34	-	1071	0.3	Углеводород C ₁₂ H ₂₆
24	9.54	96	1083 (1080*)	2	2,5-Диметил-3-этилпиразин
25	9.63	95	1088 (1088*)	3	2,3- Диметил-5-этилпиразин
26	9.75	94	1095 (1090)	0.2	2-Метоксифенол (гваякол)
27	9.83	89	1100 (1100)	0.8	Ундекан
28	9.85	90	1102 (1098)	0.4	Линаоол
29	10.04	-	1114	0.2	Углеводород C ₁₂ H ₂₆
30	10.15	96	1121 (1118)	5	2-Фенилэтиловый спирт

№	Время удерживания, минут	SI*, %	Индекс удерживания ИУ _{эксп} [*] (ИУ _{лит.})	Оценочное содержание по площадям пиков методом внутренней нормализации, %	Идентифицированный компонент
32	10.28	91	1130 (1119)	0.6	2,6-Диметилдекан
33	10.73	95	1159 (1159)	0.4	3,5-Диэтил 5-метилпиразин
36	11.37	90	1200 (1200)	0.2	Додекан
37	12.26	97	1264 (1259)	0.8	2-Фенилэтиловый эфир уксусной кислоты
38	12.81	96	1303 (1300)	0.05	Тридекан
39	13.63	94	1361 (1354)	25	Триацетин

Примечание: SI* – степень совпадения библиотечного и экспериментально полученного масс-спектров; основные компоненты, суммарное содержание которых в паровой фазе составляет около 58 % от общего количества ЛОС, выделены жирным шрифтом (principle components that represent in total approximately 58 per cent of the combined head space VOC content marked in bold).

(28 %), триацетин (25 %), 2,3,5 –триметилпиразин (15 %) и пропиленгликоль (14 %). Из этих соединений только 2,3,5 –триметилпиразин обнаруживается в какао-бобах, где он не является ведущим в группе пиразинов. Зато органолептически его вкус характеризуется как шоколадный, ореховый, в результате чего он применяется для придания продуктам шоколадной ноты.

В тех же условиях методом ГХ-МС/ТФМЭ было проведено исследование паровой фазы над образцом натурального шоколадного масла. В табл. 2 приведе-

ны результаты ГХ-МС/ТФМЭ исследования образца шоколадного масла. Из данной таблицы видно, что основной компонент паровой фазы над шоколадным маслом – 2,3-бутандиол, 2R,3R стереоизомер которого продуцируется множеством микроорганизмов. В шоколаде он, наряду с изомерным 1,3-бутандиолом, появляется на этапе ферментации какао-бобов. Какао-бобы упоминаются в качестве одного из природных источников 2-метилбутановой кислоты [31]. Таким образом, мажорные компоненты паровой фазы над шоколадным маслом являются характерными для

Таблица 2

Соединения, идентифицированные в паровой фазе над образцом натурального масла какао

Table 2

Substances identified in the head space of natural cocoa butter

№	Время удерживания, минут	SI*, %	Индекс удерживания ИУ _{эксп} [*] (ИУ _{лит.})	Оценочное содержание по площадям пиков методом внутренней нормализации, %	Идентифицированный компонент
1	3.050	93	699 (703)	0.8	2-Пентанол
2	3.190	97	708 (712)	1	3-Гидрокси- 2-бутанон, (Ацетоин)
3	3.559	96	732 (739)	0.2	1-Бутанол, 3-метил- (Изоамиловый спирт)
4	4.061	97	765 (762)	1	Толуол
5	4.229	96	776 (770)	5	2-Метилпропионовая кислота (Изобутановая кислота)
6	4.317	97	781 (773)	28	2,3-Бутандиол изомер
7	4.469	98	791 (784)	9	2,3-Бутандиол, [R-(R*,R*)]-
8	4.875	97	815 (819)	0.4	Бутиловый эфир уксусной кислоты
9	5.507	86	851 (828)	0.4	2-Пентанол, ацетат
10	5.708	92	843÷860 (840÷870)	10	Изовалериановая кислота
11	5.872	94 88	869 (870) 871 (861)	5	2-метилбутановая кислота + 1-Метокси-2-пропанола ацетат
12	5.985	93	877(876)	0.6	1-Бутанол, 3-метил-, ацетат
13	6.030	95	880 (880)	0.4	1-Бутанол, 2-метил-, ацетат
14	6.236	95	891 (890)	0.5	2-Гептанон
15	6.285	95	894 (891)	0.1	о-Ксилол
16	6.411	94	901 (900)	1	2-Гептанол

№	Время удерживания, минут	SI*, %	Индекс удерживания ИУ _{эксп} [*] (ИУ _{лит.})	Оценочное содержание по площадям пиков методом внутренней нормализации, %	Идентифицированный компонент
17	6.514	96	907 (906)	1	Бутилгликоль
18	6.588	96	911 (912)	1	2,5-Диметилпиразин
19	6.658	85	915 (917)	1	Этилпиразин
20	6.730	96	919 (920)	0.7	2,3-Диметилпиразин
21	7.513	97	963 (965)	1.6	Бензальдегид
22	8.017	90	992 (990)	0.7	β-Мирцен
23	8.086	95	996 (994)	0.6	1-Метил-3-этилбензол
24	8.140	85	999 (1000)	0.08	2-Метил-6-этилпиразин
25	8.148	80	1000 (1005)	0.5	Этиловый эфир гексановой кислоты
26	8.201	98	1003 (1010)	2.7	2,3,5-Триметилпиразин
27	8.384	88	1014 (1015)	0.6	Гексиловый эфир уксусной кислоты
28	8.689	95	1032 (1018)	5	Лимонен
29	9.241	87	1065 (1060)	0.8	2-Ацетилпиррол
30	9.341	90	1071 (1070)	0.8	Ацетофенон
31	9.505	92	1081 (1080)	0.6	2,5-Диметил-3-этилпиразин
32	9.625	98	1088 (1086)	10	Тетраметилпиразин
33	9.685	89	1092 (1095)	0.7	2-Нонанон
34	9.837	93	1101 (1098)	1.5	Линалоол
35	9.969	90	1110 (1119)	0.5	2-Изопропил-5-метил-2-гексеналь
36	10.130	93	1120 (1120)	2	Фенилэтиловый спирт
37	12.282	93	1259 (1257)	0.3	Уксусной кислоты фенилэтиловый эфир
38	14.183	82	1400 (1425)	0.1	Изоамилбензоат
39	15.464	80	1500 (1499)	0.5	5-Метил-2-фенил-2-гексеналь

Примечание: SI* – степень совпадения библиотечного и экспериментально полученного масс-спектров

какао-бобов соединениями, а основные компоненты ароматизатора, наряду с типичными для аромата какао соединениями – изовалериановой кислотой и 2,3,5-триметилпиразином, представлены растворителями (пропиленгликоль и триацетин). Таким образом, именно триацетин и пропиленгликоль в данном случае рассматриваются как маркеры искусственного ароматизатора, поскольку в натуральных продуктах они не содержатся. Эти же растворители в работе [32] рекомендовано рассматривать как маркеры фальсификации вина.

Ю.В. Пивоваровым с соавторами [33] сформулированы основные критерии, на основании которых в продукции может быть установлено присутствие искусственного ароматизатора:

1. Наличие растворителя;
2. Присутствие характерных для продукции данного наименования ароматобразующих веществ в аномальных концентрациях;
3. Присутствие нехарактерных для данного продукта соединений;

4. Отсутствие характерных для данного продукта соединений.

Сравнительный анализ содержания табл. 1 и 2 приводит к заключению, что все четыре перечисленных выше критерия могут быть применены для установления различий между натуральным и ароматизированным продуктом. В частности, в составе ароматизатора в качестве мажорных компонентов присутствуют пропиленгликоль и триацетин – наиболее часто применяемые при изготовлении липофильных ароматобразующих композиций растворители. Эти вещества, а также представленные целой группой алифатические углеводороды не характерны ни для масла, ни для шоколада. Характерный, но минорный компонент аромата обжаренных какао-бобов 2,3,5-триметилпиразин доминирует в группе пиразинов, а целый ряд характерных для натурального шоколада компонентов [34] отсутствует. Совокупность всех этих признаков обуславливает возможность идентификации искусственного ароматизатора в составе натурального продукта. Доказательными

признаками присутствия ароматизаторов являются растворители, остальные признаки имеют подтверждающий характер. Индивидуальная идентификация ароматообразующих компонентов шоколада имеет значение не только в целях выявления искусственных добавок, но и может быть полезна технологам для улучшения качества натуральных продуктов, изготавливаемых из какао-бобов. Ароматические вещества, содержащиеся в какао-бобах в очень малых количествах, играют, тем не менее, важную роль, обуславливая характерный аромат шоколада. Всего их известно около 400 [35].

Возможности контроля аутентичности образцов продукции по профилям хроматограмм, полученным при использовании неидентифицирующих детекторов, по нашему мнению, весьма ограничены ввиду высокой вариабельности натуральных ингредиентов, составляющих аромат продуктов, изготовленных из какао-бобов. Состав этих ингредиентов в значительной степени зависит от региона произрастания и степени созревания какао-бобов, а также от особенностей процессов их переработки. Предложенный подход к определению ЛОС в составе сложных матриц может быть рекомендован в качестве оптимальной техники при исследовании состава ароматообразующих композиций в пищевой и косметической продукции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Официальные рекомендации для определения состава ароматообразующих компонентов пищевых продуктов отсутствуют, что не позволяет устанавливать наличие искусственных ароматизаторов в продукции, позиционируемой как натуральная. На примере сравнительного исследования методом ГХ-МС/ТФМЭ состава ЛОС натурального шоколадного масла и искусственного ароматизатора «шоколадное масло» показана возможность идентификации маркерных признаков искусственного ароматизатора, в данном случае преимущественно представленных растворителями (пропиленгликоль и триацетин). Для идентификации ЛОС в объектах с высоким содержанием жиров отбор пробы на микроволокно с одновременным концентрированием уловленных компонентов обеспечивает преодоление матричного эффекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. New York: Wiley-VCH, 1997. 264 p.
2. Определение состава и оценка содержания летучих углеводов в почве методом твердофазной микроэкстракции и газовой хроматографии/масс-спектрометрии / Е.С. Бродский [и др.] // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17, № 1. С. 59-65.
3. Методика измерений массовых концентраций летучих экотоксикантов в биологических пробах методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Свидетельство от 08.11.13 № 222.0319/01.00258/2013.
4. Study of the vapor phase over fusarium fungi cultured on various substrates / E.I. Savelieva [et al.] // Chemistry and Biodiversity. 2016. V. 13. P. 891–903.
5. High-sensitivity determination of 2-chlorovinylarsonous acid in biomedical samples for retrospective detection of exposure to lewisite upon antidotal therapy / N.L. Koryagina [et al.] // Journal of Spectroscopy. 2011. V. 26. P. 1-10.
6. Савельева Е.И., Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю. Применение твердофазной микроэкстракции в сочетании с газовой хромато-масс-спектрометрией для исследования летучих продуктов биосинтеза, выделяемых растениями и микроорганизмами // Журнал аналитической химии. 2014. Т. 69, № 7. С. 675-682.
7. Савельева Е.И., Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю. Исследование состава летучих органических соединений, выделяемых микроскопическим грибом fusarium culmorum, методом газовой хромато-масс-спектрометрии в сочетании с твердофазной микроэкстракцией // Экологическая химия. 2014. Т. 23, № 2. С. 110-118.
8. Rout P.K., Rao Y.R., Naik S.N. Analysis of floral volatiles by using headspace solid phase microextraction: a review // Asian J. Chem. 2012. V. 24. P. 945–956.
9. Татарченко И.А. Разработка новых видов чайной и кофейной продукции и совершенствование оценки их качества: дисс. канд. техн. наук: 05.18.05. Краснодар, 2015. 200 с.
10. Dymerski T. Two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry in food analysis // Crit. Rev. Anal. Chem. 2018. V. 48. P. 252 – 278.
11. Development of an HS-SPME-GC method to determine the methyl anthranilate in Citrus honeys / D. Bertelli [et al.] // Food Chemistry. 2008. V. 108. P. 297–303.
12. Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines / Bueno M. [et al.] // Food Research International. 2010. V. 43. P. 1423–1428.
13. Bueno M., Zapata J., Ferreira V. Simultaneous determination of free and bonded forms of odor-active carbonyls in wine using a headspace solid phase microextraction strategy // Journal of Chromatography A. 2014. V. 1369. P. 33–42.
14. Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry / D. Saison [et al.] // Journal of Chromatography A. 2009. V. 1216. P. 5061–5068.
15. Detection of the adulteration of olive oils by solid phase microextraction and multidimensional gas chromatography / G. Flores [et al.] // Food Chemistry. 2006. V. 97. P. 336–342.
16. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods / S Bansal [et al.] // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2017. V. 57. P. 1174–1189.
17. [Электронный ресурс]: [23](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91: Regulations of European Parliament, C. of the E.U. 2008. (дата обращения 09.01.2019).
18. Barel M., Leon D., Vincent J.C. Influence of cocoa fermentation time on the production of pyrazines in chocolate // The Café Cacao. 1985. V. 4. P. 277–286.
19. Granvogel M., Bugan S., Schieberle P. Formation of amines and aldehydes from parent amino acids during thermal processing of cocoa and model systems: new insights into pathways of the strecker reaction // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. V. 54. P. 1730-1739.

</div>
<div data-bbox=)

20. Jinap S., Dimick P.S., Hollender R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries // *Food Control*. 1995. V. 6. P. 105-110.
21. Талибова А., Колеснов А. Оценка качества и безопасности пищевой продукции методом изотопной масс-спектрометрии // *Аналитика*. 2011. № 1. С. 44-48.
22. Krueger H.W., Reesman R.H. Carbon isotope analyses in food technology // *Mass spectrometry review*. 1982. № 1. P. 205–236.
23. Gremaud G., Hilkert A. Isotopic-Spectroscopic Technique: Stable Isotopic Ratio Mass Spectrometry (IRMS) // *Modern Techniques for Food Authentication* / Ed. Da-Wen Sun. – Elsevier. 2008. P. 269–312.
24. Fast headspace-enantioselective GC–mass spectrometric-multivariate statistical method for routine authentication of flavoured fruit foods / C. Cagliero [et al.] // *Food Chem*. 2012. V. 132. P. 1071–1079.
25. Authenticity assessment of natural fruit flavour compounds in foods and beverages by auto-HS-SPME stereoselective GC-MS / U. Ravid [et al.] // *Flavour Fragr. J*. 2010. V. 25. P. 20–27.
26. Comprehensive two-dimensional gas chromatography and three-dimensional fluorometry for detection of volatile and bioactive substances in some berries / Dymerski T. [et al.] // *Talanta*. 2015. V. 134. P. 460-467.
27. Quality of limes juices based on the aroma and antioxidant properties / M. Lubinska-Szczygiel [et al.] // *Food Contr*. 2018. V. 89. P. 270-279.
28. van den Dool H., Kratz P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography // *J. Chromatogr*. 1963. V. 11. P. 463–471.
29. Gorecki T., Yu X., Pawliszyn J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres / *Analyst*. 1999. V. 124. P. 643-649.
30. [Электронный ресурс]: <https://webbook.nist.gov/chemistry/gc-ri/> / NIST Standard Reference Database Number 69. Gas Chromatographic Retention Indices (дата обращения февраль - август 2018.).
31. Ziegler G. Flavour development in cocoa and chocolate // *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use*. 2017. P. 185-215.
32. Оселедцева И.В., Якуба Ю.Ф., Резниченко К.В. Эффективный метод выявления синтетических ароматизаторов в винодельческой продукции // *Плодоводство и виноградарство юга России*. 2011. №7(1). С. 69-81.
33. Пивоваров Ю.В., Иванова Е.В., Зенин П.А. Контроль использования ароматизаторов в пищевой продукции // *Пиво и напитки*. 2003. № 4. С. 46-49.
34. Frauendorfer F., Schieberle P. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations // *J Agric Food Chem*. 2006. V. 54. P. 5521–5529.
35. Biehl B., Meursing E.H. Cocoa - production, products and uses // *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition*: Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ (eds). Academic Press. London. V. 2. P. 1083–1097.
3. *Metodika izmerenii massovykh koncentratsii letuchikh ekotoksikantov v biologicheskikh probakh metodom gazovoi hromato-mass-spektrometrii* [Methods of measuring mass concentrations of volatile ecotoxicants in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry]. Certificate no. 222.0319/01.00258/2013. 08.11.13. (in Russian).
4. Savelieva E.I., Gustyleva L.K., Kessenikh E.D., Khlebnikova N.S., Leffingwell J., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu. Study of the vapor phase over fusarium fungi cultured on various substrates. *Chemistry and Biodiversity*, 2016, vol. 13, pp. 891–903. DOI: 10.1002/cbdv.201500284
5. Koryagina N.L., Ukolova E.S., Savel'eva E.I., Voitenko N.G., Orlova O.I., Jenkins R.O., Goncharov N.V. High-sensitivity determination of 2-chlorovinylarsonous acid in biomedical samples for retrospective detection of exposure to lewisite upon antidotal therapy. *Journal of Spectroscopy*, 2011, vol. 26, pp. 1-10. DOI: 10.1155/2011/840141
6. Savelieva E.I., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Y. Using solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the study of the volatile products of biosynthesis released by plants and microorganisms. *Journal of Analytical Chemistry*, 2014, vol. 69, no. 7, pp. 609-615. DOI: 10.1134/s1061934814050086
7. Savel'eva, E.I., Gavrilova, O.P., Gagkaeva, T.Y. Study of the composition of volatile organic compounds emitted by the filamentous fungus *Fusarium culmorum* by gas chromatography-mass spectrometry combined with solid phase microextraction. *Russian Journal of General Chemistry*, 2014, vol. 84, no. 13, pp. 2603-2610. DOI: 10.1134/s1070363214130180
8. Rout P.K., Rao Y.R., Naik S.N. Analysis of floral volatiles by using headspace solid phase microextraction: a review. *Asian J. Chem.*, 2012, vol. 24, pp. 945–956.
9. Tatarchenko I.A. *Razrabotka novykh vidov chainoi i kofeinoi produktsii i sovershenstvovanie otsenki ikh kachestva*. Diss. kand. tehn. nauk [Development of new types of tea and coffee products and improvement of their quality assessment. Dr. tech. sci. diss.]. Krasnodar, 2015. 200 p. (in Russian)
10. Dymerski T. Two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry in food analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem*, 2018, vol. 48, pp. 252–278. DOI: 10.1080/10408347.2017.1411248
11. Bertelli D., Papotti G., Lolli M., Sabatini A.G., Plessi M. Development of an HS-SPME-GC method to determine the methyl anthranilate in Citrus honeys. *Food Chemistry*, 2008, vol. 108, pp. 297–303. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.019
12. Bueno M., Culleré L., Cacho J., Ferreira V. Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines] *Food Research International*, 2010, vol. 43, pp. 1423–1428. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.04.003
13. Bueno M., Zapata J., Ferreira V. Simultaneous determination of free and bonded forms of odor-active carbonyls in wine using a headspace solid phase microextraction strategy. *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1369, pp. 33–42. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.10.004
14. Saison D., De Schutter D.P., Delvaux F., Delvaux F.R. Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, pp. 5061–5068. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.04.077
15. Flores G., Luisa M., del Castillo R., Blanch G.P., Herranz M. Detection of the adulteration of olive oils by solid phase microextraction and multidimensional gas chromatography. *Food Chemistry*, 2006, vol. 97, pp. 336–342. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.021
16. Bansal S., Singh A., Mangal M., Mangal A.K., Kumar S. Food adulteration: Sources, health risks, and detection

REFERENCES

1. Pawliszyn J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. New York, Wiley-VCH, 1997. 264 p.
2. Brodsky E.S., Butkova O.L., Shelepchikov A.A., Mir-Kadyrova E.Ya., Kalinkevich G.A., Jilnikov V.G., Phesin D.B. [Evaluation of the content and composition of volatile petroleum hydrocarbons in soil by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry]. *Analitika i kontrol'*. 2013, vol. 17, no. 1, pp. 59-65 (in Russian).

- methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, vol. 57, pp. 1174–1189. DOI: 10.1080/10408398.2014.967834
17. Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91: Regulations of European Parliament, C. of the E.U. 2008. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ> (accessed 09 January 2019).
18. Barel M., Leon D., Vincent J.C. Influence of cocoa fermentation time on the production of pyrazines in chocolate. *The Café Cacao*, 1985, vol. 4, pp. 277–286.
19. Granvogel M., Bugan S., Schieberle P. Formation of amines and aldehydes from parent amino acids during thermal processing of cocoa and model systems: new insights into pathways of the strecker reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, vol. 54, pp. 1730–1739. DOI: 10.1021/jf0525939
20. Jinap S., Dimick P.S., Hollender R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control*, 1995, vol. 6, pp. 105–110.
21. Talibova A., Kolesnov A. [Evaluation of the quality and safety of food products by isotope mass spectrometry]. *Analitika*, 2011, no. 1, pp. 44–48 (in Russian)
22. Krueger H.W., Reesman R.H. Carbon isotope analyses in food technology. *Mass spectrometry review*, 1982, no. 1, pp. 205–236.
23. Gremaud G., Hilker A. Isotopic-Spectroscopic Technique: Stable Isotopic Ratio Mass Spectrometry (IRMS). *Modern Techniques for Food Authentication/Ed. Da-Wen Sun. – Elsevier*, 2008, pp. 269–312. DOI: 10.1016/b978-0-12-814264-6.00011-6
24. Cagliero C., Bicchi C., Cordero C., Rubiolo P., Sgorbini B., Liberto E. Fast headspace-enantioselective GC–mass spectrometric-multivariate statistical method for routine authentication of flavoured fruit foods. *Food Chem*, 2012, vol. 132, pp. 1071–1079. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.10.106
25. Ravid U., Elkabetz M., Zamir C., Cohen K., Larkov O., Aly R. Authenticity assessment of natural fruit flavour compounds in foods and beverages by auto-HS-SPME stereoselective GC-MS. *Flavour Fragr. J.*, 2010, vol. 26, pp. 20–27. DOI: 10.1002/ffj.1953
26. Dymerski T., Namieśnik J., Vearasilp K., Arancibia-Avila P., Toledo F., Weisz M., Katrich E., Gorinstein S. Comprehensive two-dimensional gas chromatography and three-dimensional fluorimetry for detection of volatile and bioactive substances in some berries. *Talanta*, 2015, vol. 134, pp. 460–467. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.11.061
27. Lubinska-Szczygieł M., Rozanska A., Namiesnik J., Dymerski T., Shafreen R.B., Weisz M., Ezra A., Gorinstein S. Quality of limes juices based on the aroma and antioxidant properties. *Food Contr*, 2018, vol. 89, pp. 270–279. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.02.005
28. van den Dool H., Kratz P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. *J. Chromatogr*, 1963, vol. 11, pp. 463–471. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)80947-x
29. Gorecki T., Yu X., Pawliszyn J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst*, 1999, vol. 124, pp. 643–649. DOI: 10.1039/a808487d
30. NIST Standard Reference Database Number 69. *Gas Chromatographic Retention Indices*. Available at: <https://webbook.nist.gov/chemistry/gc-ri/> (accessed: from February to August 2018.).
31. Ziegler G. Flavour development in cocoa and chocolate. *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use*, 2017, pp. 185–215. DOI: 10.1002/9781118923597.ch8
32. Oseledceva I.V., Jakuba Ju.F., Reznichenko K.V. [An effective method for the detection of synthetic flavors in wine products]. *Plodovodstvo i vinogradarstvo iuga Rossii [Fruit growing and viticulture of the south of Russia]*, 2011, no. 7(1), pp. 69–81. (in Russian)
33. Pivovarov Ju.V., Ivanova E.V., Zenin P.A. [Control the use of flavors in food products]. *Pivo i napitki [Beer and drinks]*, 2003, no. 4, pp. 46–49. (in Russian)
34. Frauendorfer F., Schieberle P. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. *J. Agric Food Chem*, 2006, vol. 54, pp. 5521–5529. DOI: 10.1021/jf060728k
35. Biehl B., Meursing E.H. Cocoa - production, products and uses. *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition: Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ (eds). Vol. 2. London, Academic Press, 1993, pp.1083–1097.*