

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАЛЬСИФИКАЦИИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ И РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ ПО ЖИРНОКИСЛОТНОМУ СОСТАВУ

Д.С. Большаков¹, Д.В. Юдина², Т.Б. Никешина³

¹ старший научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

² ведущий технолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: yudina@arriah.ru

³ заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир, e-mail: nikeshina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В работе представлена усовершенствованная методика определения жирнокислотного состава молочной и растительной продукции, которая позволяет выявлять фальсификацию растительного масла, молока и молочных продуктов.

Ключевые слова: жирнокислотный состав, фальсификация, молочная продукция, растительное масло, газовая хроматография.

DETERMINATION OF ADULTERATIONS IN DAIRY PRODUCTS AND VEGETABLE OILS BASED ON THEIR FATTY ACID COMPOSITIONS

D.S. Bolshakov¹, D.V. Yudina², T.B. Nikeshina³

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

² Leading Technologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: yudina@arriah.ru

³ Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nikeshina@arriah.ru

SUMMARY

Improved method for determination of fatty acid compositions of dairy and plant products that allows detection of adulterations in vegetable oils, milk and dairy products is described in the paper.

Key words: fatty acid composition, adulteration, dairy products, vegetable oil, gas chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

Современный рынок предлагает потребителю широкий выбор отечественных и импортных продовольственных товаров. Не секрет, что значительное расширение ассортимента продуктов питания на потребительском рынке не обходится без стремления выпускать под видом известных товарных марок явные подделки или продукцию заведомо заниженного качества. Одним из видов подделки масложировой и молочной продукции является замена молочных жиров продуктами немолочного происхождения, например, растительными жирами. Фальсификация растительного масла главным образом заключается в подмене или разбавлении дорогих сортов более дешевыми (например, разбавление оливкового масла рапсовым). Для выявления подобных случаев используют следующие приемы:

- определение жирнокислотного состава (массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот) растительного масла и животных жиров;
- обнаружение растительных жиров в жировой фазе молока и молочных продуктов по анализу стеринной фракции;
- определение триглицеридного состава жировой фазы продукта;
- определение *транс*-изомеров жирных кислот жировой фазы продукта.

Одним из наиболее эффективных методов выявления фальсификации молочных и растительных продуктов является определение их жирнокислотного состава (ЖКС) и последующее сопоставление его с табличным, стандартным составом, приведенным в нормативной документации (НД). Основными требованиями, предъявляемыми к методам определения жирных кислот (ЖК), являются высокая чувствительность, селективность и достоверность полученных результатов. Для определения ЖКС молочной и растительной продукции используют методы спектрального анализа (ИК-спектроскопия, ядерный магнитный резонанс) [17, 18], но наиболее достоверными являются хроматографические методы: тонкослойная (ТСХ) [25], газовая (ГХ) [25], высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [20]. Заключение о соответствии/несоответствии анализируемого образца проводят путем сопоставления полученных результатов с регламентируемым составом конкретных видов продукции, приведенным в НД [2–4, 8].

Качество молочной продукции характеризуется и составом стеринной фракции, который устанавливают хроматографическими методами [7, 19, 26]. Состав стеринной фракции четко зависит от природы жира (животного или растительного происхождения). При использовании исключительно молочного жира в стеринной фракции должен находиться только холестерин. В растительных жирах холестерина практически нет, но присутствуют другие стерины, а именно: брасикастерин, кампастерин, стигмастерин, β-ситостерин и т.д. Определение фальсификации продукции по составу стеринной фракции (а именно по содержанию растительных стерин) является наиболее достоверным методом, который позволяет выявить добавки масел растительного происхождения от 2% и выше. При этом на хроматограмме фиксируют пики фитостерин, эти компоненты подтверждают факт фальсификации.

Хроматографические методы определения ЖКС и состава стеринной фракции могут быть взаимно

уточняющими при определении фальсификации молочной продукции.

Основным недостатком данного приема является трудоемкость анализа, связанная с осаждением стерин в виде дигитонинов и дальнейшей перекстракцией полученных производных в подходящий растворитель [7].

Альтернативным способом выявления фальсификации растительного масла и молочной продукции является определение триглицеридного состава (триацилглицеридов) жировой фазы продукта, для чего используют методы ГХ и ВЭЖХ [15, 16].

Подавляющее большинство природных жиров и масел представляют собой смесь разнокислотных триглицеридов. Триглицеридный состав жиров и масла достаточно индивидуален, и это свойство может быть использовано для предварительной идентификации масел, жиров и масложировой композиции. Однако большое число триглицеридов, из которых и состоит жировая фаза продукта, осложняет широкое использование данного подхода. Проанализировать большой спектр триглицеридов и собрать необходимое количество статистических данных затруднительно, это требует больших временных затрат и использования дорогостоящего оборудования (ВЭЖХ-МС) [15, 16].

Определение фальсификации по нескольким наиболее характерным триглицеридам намного упрощает методологию анализа, но может быть использовано главным образом для растительных жиров [15]. В связи с этим определение триглицеридного состава жировой фазы для выявления несоответствующей продукции не получило столь широкого распространения. На территории Российской Федерации определение триглицеридного состава стандартизовано только для анализа заменителей какао-масла [1], для оценки содержания эквивалентов масла какао в масле какао и шоколаде методом ГХ-ПИД [9, 10].

Для фальсификации молочной продукции наиболее часто используют гидрированные жиры или смеси с другими маслами, применение которых должно быть ограничено из-за высокого содержания в них *транс*-изомеров жирных кислот (ТИЖК). ТИЖК образуются в жирах в процессе гидрогенизации, дезодорации, отбеливания и воздействия высоких температур [11]. *Транс*-жиры обладают усвояемостью, одинаковой с обычными жирами. Входя во все липидные структуры организма, например, в клеточные мембраны, *транс*-жиры нарушают транспорт веществ через них, передачу сигналов, работу рецепторов на мембранах, биохимию вспомогательных процессов.

Содержание ТИЖК на территории РФ в масложировой продукции (заменители молочного жира, маргарины, жиры специального назначения, эквиваленты и заменители масла какао) нормируется в соответствии с Техническим регламентом [13].

Однако *транс*-жиры присутствуют и в натуральных продуктах (молоко и мясо жвачных животных) в количестве от 4 до 8%. В жире молока и мяса жвачных животных преобладает один из *транс*-изомеров олеиновой кислоты C_{18:1}(t11), названный вакценовой кислотой (содержание от 0,5 до 4%), и один из *транс*-изомеров линолевой кислоты C_{18:2}(c9, t11), названный руменовской кислотой (содержание от 0,2 до 2%) [11, 12].

Для определения содержания ТИЖК применяют современные методы ИК-спектроскопии [6], капиллярной ГХ [6, 22, 24]. Ион-серебряную ТСХ [22] и ВЭЖХ [14]

обычно используют для разделения и определения транс-(C_{18:1})-изомеров в частично гидрированных маслах и молочных жирах. Возможно использование комбинированных методов: ГХ в сочетании с ТСХ и ВЭЖХ [22, 23], что, несомненно, усложняет процедуру проведения анализа.

Новые хроматографические и масс-спектрометрические методы позволяют детектировать следовые количества ТИЖК. Но остаются проблемы, связанные с перекрытием цис- и транс-изомеров, то есть с неполным отделением изомеров транс-кислот от их цис-компонентов. Нет универсальных методов определения для всех образцов масложировой продукции. Решением этих и других проблем определения ТИЖК активно занимаются в настоящее время.

Исходя из представленного обзора существующих подходов к выявлению фальсификации растительной и молочной продукции, можно сказать, что наиболее универсальным для растительных и животных жиров и проработанным с точки зрения нормативной базы является метод определения ЖКС жировой фазы продукта.

Цель данной работы заключалась в усовершенствовании методики определения жирнокислотного состава молочной и растительной продукции для выявления фальсификации растительного масла, молока и молочных продуктов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование: газовый хроматограф «ХРОМОС ГХ-1000» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором (ПИД), оснащенный программным пакетом для управления газовым хроматографом «ХРОМОС»; капиллярная колонка «DB-23» (Agilent Technologies, Inc, США) длиной 60 м, внутренним диаметром 0,32 мм с нанесенной фазой 50%-цианопропил-50%-метилполисилоксан (толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм); весы лабораторные Ohaus Pioneer PA 214C специального класса точности с ценой деления 0,1 мг, наибольшим пределом взвешивания 210 г; весы лабораторные электронные Ohaus SP-202 Scout Pro Balance высокого класса точности с ценой деления 0,01 г, наибольшим пределом взвешивания 200 г; микродозаторы Biohit с переменным объемом 10–100, 100–1000, 1000–5000 мкл и пределом допускаемой погрешности измерения не более ±2%; центрифуга лабораторная MiniSpin; центрифуга лабораторная медицинская «ОПн-3м»; центрифуга лабораторная MPW-260R; баня водяная (термальная ванна) BW-0510H Lab Companion.

Химическая посуда и материалы: пробирки одноразовые (типа эппендорф) вместимостью 1,5 мл; пробирки одноразовые вместимостью 15 мл; виалы с завинчивающимися крышками вместимостью 2 мл; фильтры обеззоленные «синяя/красная лента»; микрошприц хроматографический объемом 10 мкл; колбы мерные по ГОСТ 1770-74.

Для градуировки хроматографической системы и контроля качества проводимых исследований использовали следующие стандартные образцы: состав смеси 37 метиловых эфиров жирных кислот (F.A.M.E.) Supelco (Supelco TM 37 Component FAME Mix, Catalog № 47885-U); состав растительного и животного жира Restek:

1) AOCS #1 (cat. № 35022) для анализа кукурузного, макового, хлопкового, соевого, орехового, сафлорово-

го, подсолнечного, рисового, кунжутного масла и масла отрубей;

2) AOCS #2 (cat. № 35023) для анализа периллового, конопляного масла, масла льняного семени и семян каучукового дерева;

3) AOCS #4 (cat. № 35025) для анализа оливкового, костяного масла и масла камелии;

4) AOCS #6 (cat. № 35027) для анализа сала, говяжьего или бараньего жира и пальмового масла;

5) AOCS #3 (cat. № 35024) для анализа арахисового, рапсового и горчичного масла.

Реактивы: метанол, 99,5%, Panreac; гексан, 99,5%, Panreac; гептан, 99,5%, Panreac; пентан, 99,5%, Panreac; метилат натрия, Sigma; спирт этиловый (этанол), 95% (раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм), ЗАО «Брынцалов-А».

Пробоподготовка

Растительное масло: 2–3 капли анализируемой пробы растительного масла растворяли в 1 мл гексана. Добавляли к растворенной пробе 50 мкл раствора 2 М метилата натрия в метаноле, перемешивали подготовленный образец в течение 1 мин. Затем выдерживали реакцию смесь в течение 15 мин. Центрифугировали в течение 10 мин, после чего проводили хроматографический анализ.

Молочные продукты, сметана, творог, сыр: жировую фазу из 1 г гомогенизированной пробы экстрагировали в 1 мл гексана в течение 10 мин при постоянном перемешивании. Для проб сыра экстракционную смесь выдерживали при температуре 80–85°C в течение 20 мин. После центрифугирования при 2700 об/мин в течение 10 мин добавляли к 950 мкл полученного супернатанта (центрифугата) 50 мкл раствора 2 М метилата натрия в метаноле. Перемешивали пробу в течение 1 мин. Затем выдерживали реакцию смесь в течение 15 мин. Центрифугировали в течение 10 мин, после чего проводили хроматографический анализ.

Сливочное масло: жировую фазу из 0,5 г пробы, размягченной при температуре 40–50°C, экстрагировали в 1 мл гексана в течение 10 мин при постоянном перемешивании. После центрифугирования при 2700 об/мин в течение 10 мин добавляли к 950 мкл полученного супернатанта (центрифугата) 50 мкл раствора 2 М метилата натрия в метаноле. Перемешивали пробу в течение 1 мин. Затем выдерживали реакцию смесь в течение 15 мин. Центрифугировали в течение 10 мин, после чего проводили хроматографический анализ.

Молоко: жировую фазу из 0,5 г (0,5 мл) пробы экстрагировали в 1 мл гексана в присутствии 0,5 мл этилового спирта (для удаления белковой фракции) при постоянном перемешивании в течение 10 мин. После центрифугирования при 2700 об/мин в течение 10 мин добавляли к 950 мкл полученного супернатанта (центрифугата) 50 мкл раствора 2 М метилата натрия в метаноле. Перемешивали пробу в течение 1 мин. Затем выдерживали реакцию смесь в течение 15 мин. Центрифугировали в течение 10 мин, после чего проводили хроматографический анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стандартный метод определения ЖКС основан на жидкостной экстракции липидов животного происхождения органическим растворителем, позволяющим выделить 90–95% всех клеточных липидов, концентрировании полученного экстракта и его использовании для метилирования липидных триглицеридов посредством

гидролиза с последующим переводом полученных ЖК в метиловые эфиры и хроматографическим анализом смесей методом ГХ-ПИД для выявления состава и определения массовой доли индивидуальных ЖК.

Усовершенствованная методика предполагает совмещение стадий экстракции жировой фазы и получения производных (метиловых эфиров), что позволит сделать анализ простым, экспрессным, экономичным и экологичным (за счет применения малых объемов органических растворителей). Для использования методики в рутинном анализе необходимо:

- оптимизировать условия хроматографического разделения метиловых эфиров жирных кислот жировой фазы продукта;
- оптимизировать условия пробоподготовки;
- провести контроль с использованием стандартных и контрольных образцов;
- провести анализ реальных объектов с целью выявления фальсификации.

Условия хроматографирования и градуировка хроматографической системы. Определение фальсификации молочной и растительной продукции по ЖКС основано на использовании метода внутренней нормализации (внутренней нормировки) — метода определения содержания компонента в смеси, при котором сумму каких-либо параметров, например, сумму площадей всех пиков, принимают за 100%, тогда отношение площади отдельного пика к сумме площадей при умножении на 100 будет характеризовать массовую долю (%) компонента в смеси. Данный метод не требует построения привычной градуировочной зависимости площадей анализируемых компонентов от их концентрации.

Однако градуировка хроматографической системы необходима для оценки времен элюирования метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) с целью дальнейшей правильной идентификации пиков.

Хроматографирование проводили на капиллярной колонке DB-23 при температуре испарителя 200°C, температуре детектора 240°C. Газ-носитель (подвижная фаза) — азот, расход 80 мл/мин. В хроматограф вводили 1 мкл пробы без деления потока. Для надежного разделения метиловых эфиров применяли программное изменение температуры колонки в процессе хроматографирования по следующей схеме (общее время анализа — 21,5 мин):

- начальная температура колонки 100°C;
- градиентное увеличение температуры до 120°C со скоростью 8°C/мин в течение 2,5 мин;
- градиентное увеличение температуры до 230°C со скоростью 10°C/мин в течение 11 мин;
- изотермический участок при температуре 230°C в течение 8 мин.

Градуировку (калибровку) проводили с использованием стандартного образца состава смеси 37 метиловых эфиров жирных кислот. Для расчета доверительного интервала времени элюирования МЭЖК хроматографирование стандартной смеси проводили в трех повторностях (N=3). Полученные результаты приведены в табл. 1. На рис. 1 представлена хроматограмма стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот.

Стандартная смесь оптимальна по составу для анализа жирных кислот как животного (в том числе молочного), так и растительного происхождения. В соответствии с действующей нормативной документацией при анализе молока и молочной продукции, маргарина

Таблица 1
Калибровка хроматографической системы при определении ЖКС (n=3)

Условное обозначение жирных кислот	Наименование кислоты		Время элюирования, мин
	По женеvской номенклатуре	По тривиальной номенклатуре	
C _{4:0}	Бутановая	Масляная	2,97 ± 0,02
C _{6:0}	Гексановая	Капроновая	3,49 ± 0,02
C _{8:0}	Октановая	Каприловая	4,57 ± 0,02
C _{10:0}	Декановая	Каприновая	6,26 ± 0,02
C _{11:0}	Ундекановая	Ундекановая	7,25 ± 0,02
C _{12:0}	Додекановая	Лауриновая	8,25 ± 0,02
C _{13:0}	Тридекановая	Тридекановая	9,26 ± 0,02
C _{14:0}	Тетрадекановая	Миристиновая	10,23 ± 0,02
C _{14:1}	Миристолеиновая	Миристолеиновая	10,63 ± 0,02
C _{15:0}	Пентадекановая	Пентадекановая	11,18 ± 0,02
C _{15:1}	Пентадеценивая	Пентадеценивая	11,58 ± 0,02
C _{16:0}	Гексадекановая	Пальмитиновая	12,09 ± 0,02
C _{16:1}	Гексадеценивая	Пальмитолеиновая	12,37 ± 0,02
C _{17:0}	Гептадекановая	Маргариновая	12,95 ± 0,02
C _{17:1}	Гептадеценивая	Гептадеценивая	13,24 ± 0,02
C _{18:0}	Октадекановая	Стеариновая	13,79 ± 0,02
C _{18:1n9t}	Элаидиновая	Элаидиновая	13,93 ± 0,02
C _{18:1n9c}	Октадеценивая	Олеиновая	14,03 ± 0,02
C _{18:2n6t}	Линолеидиновая	Линолеидиновая	14,24 ± 0,02
C _{18:2n6c}	Октадекадиеновая	Линолевая	14,49 ± 0,02
C _{18:3n3}	Гамма-линоленовая	Гамма-линоленовая	14,78 ± 0,02
C _{18:3n3}	Октадекатриеновая	Линоленовая	15,09 ± 0,02
C _{20:0}	Эйкозановая	Арахидиновая	15,60 ± 0,02
C _{20:1}	Эйкозеновая	Гондоиновая	15,91 ± 0,02
C _{20:2}	Эйкозациеновая	Эйкозациеновая	16,49 ± 0,03
C _{20:3n6}	Эйкозатриеновая	Эйкозатриеновая	16,64 ± 0,02
C _{20:3n3}	Эйкозатриеновая	Эйкозатриеновая	16,86 ± 0,02
C _{20:4n6}	Арахидиновая	Арахидиновая	17,11 ± 0,02
C _{21:0}	Генэйкозановая	Генэйкозановая	17,27 ± 0,02
C _{22:0}	Докозановая	Бегеновая	17,84 ± 0,03
C _{22:1n9}	Докозеновая	Эруковая	17,97 ± 0,03
C _{22:2}	Докозациеновая	Докозациеновая	18,29 ± 0,03
C _{22:3n3}	Докозагексаеновая	Докозагексаеновая	19,12 ± 0,03
C _{23:0}	Трикозановая	Трикозановая	19,26 ± 0,04
C _{24:0}	Тетракозановая	Лигноцериновая	20,97 ± 0,04
C _{24:1}	Тетракозеновая	Нервоновая	21,74 ± 0,05

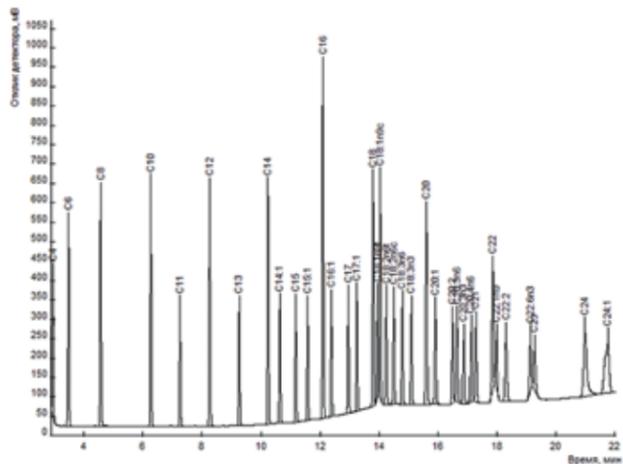


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси 37 метиловых эфиров жирных кислот (условные обозначения приведены в табл. 1)

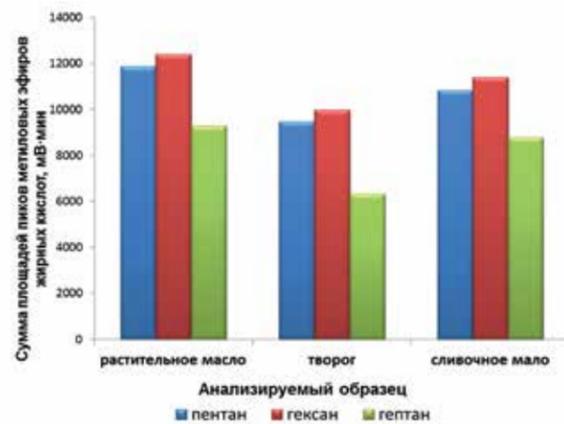


Рис. 2. Зависимость суммы площадей пиков МЭЖК от природы экстрагирующего растворителя

и маргариновой продукции определяют жирнокислотный состав с $C_{4,0}$ по $C_{22,0}$ при анализе растительных масел — с $C_{14,0(16,0)}$ по $C_{22,0}$.

Оптимизация условий пробоподготовки. Этап подготовки пробы является ключевым моментом при определении ЖКС, поскольку ошибки, сделанные на этой стадии, могут привести не только к искажению действительных результатов, но и к поломке используемого в работе дорогостоящего оборудования, обусловленной низкой степенью гидролиза и недостаточной очисткой пробы.

Условия выделения жировой фазы и очистки образца. Для проведения исследования ЖКС образцов молочной и масложировой продукции необходимо отделение жировой фазы от мешающих нежировых компонентов. Эта процедура для молочных и растительных жиров схожа. Поэтому все жиры образца подвергаются изучению и определению без исключения. Если жирность продукта менее 2%, то его ЖКС определять крайне сложно и нецелесообразно.

Проблема экстракции жировой фазы наиболее актуальна для молочных продуктов и масложировой про-

дукции, поскольку растительные масла представляют собой концентрированные триглицериды жирных кислот и могут подвергаться непосредственной реакции переэтерификации при условии разбавления в подходящем растворителе.

Стандартные методики определения ЖКС основаны на выделении жировой фазы продукта в чистом виде, что затруднено при работе с образцами небольшой массы (5–10 г) и образцами низкой жирности. По этой причине проведение реакции переэтерификации удобно совместить со стадией экстракции жировой фазы. Кроме того, при выполнении стандартной процедуры экстракции часто образуется стойкая, неосаждаемая эмульсия. Для решения этой проблемы необходимо добавить небольшое количество этилового спирта, что приведет к свертыванию белка продукта. Этот подход используется и для снижения силы поверхностного натяжения в случае наличия эмульгаторов в образце.

Для выбора подходящего растворителя проводили определение ЖКС образцов творога, сливочного и растительного масла в соответствии со схемой 1.

Схема 1. Выбор оптимального растворителя для подготовки проб растительных и молочных продуктов

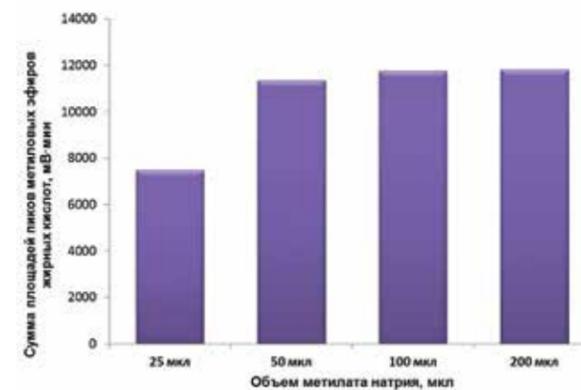


Рис. 3. Зависимость суммы площадей пиков МЭЖК от используемого объема 2 М раствора метилата натрия

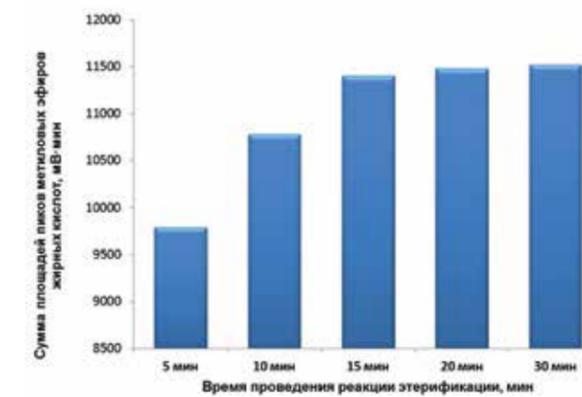


Рис. 4. Зависимость суммы площадей пиков МЭЖК от времени проведения реакции этерификации

Выбор оптимального растворителя проводили по зависимости суммы площадей пиков определяемых компонентов, полученных на хроматограмме экстракта анализируемого продукта, от природы растворителя (пентана, гексана или гептана). Полученные данные представлены на рис. 2.

Из данных, представленных на рис. 2, следует, что площади пиков максимальны при использовании в качестве экстрагирующего растворителя *n*-гексана. Применение гептана приводит к уменьшению площадей пиков, особенно жирных кислот с низким числом атомов углерода (с $C_{4,0}$ по $C_{10,0}$). По полученным результатам сложно отдать приоритет использованию пентана или гексана, однако основным недостатком пентана является его повышенная летучесть.

Условия проведения реакции этерификации. Для оптимизации условий реакции получения МЭЖК из триглицеридов, содержащихся в жировой фазе исследуемых образцов, варьировали объем реагента метилата натрия (2 моль/л), добавленного в реакционную смесь, и время проведения реакции.

Выбор объема метилата натрия. Для выбора оптимального объема метилата натрия проводили серию экспериментов: реакции гидролиза и метилирования ЖК при добавлении 25, 50, 100 и 200 мкл раствора метилата натрия концентрацией 2 моль/л к 950 мкл гексанового экстракта сливочного масла. Полученная зависимость суммы площадей пиков МЭЖК подготовленного экстракта от объема добавленного реагента представлена на рис. 3.

Схема 2. Определение ЖКС молочной продукции и растительного масла методом ГХ-ПИД

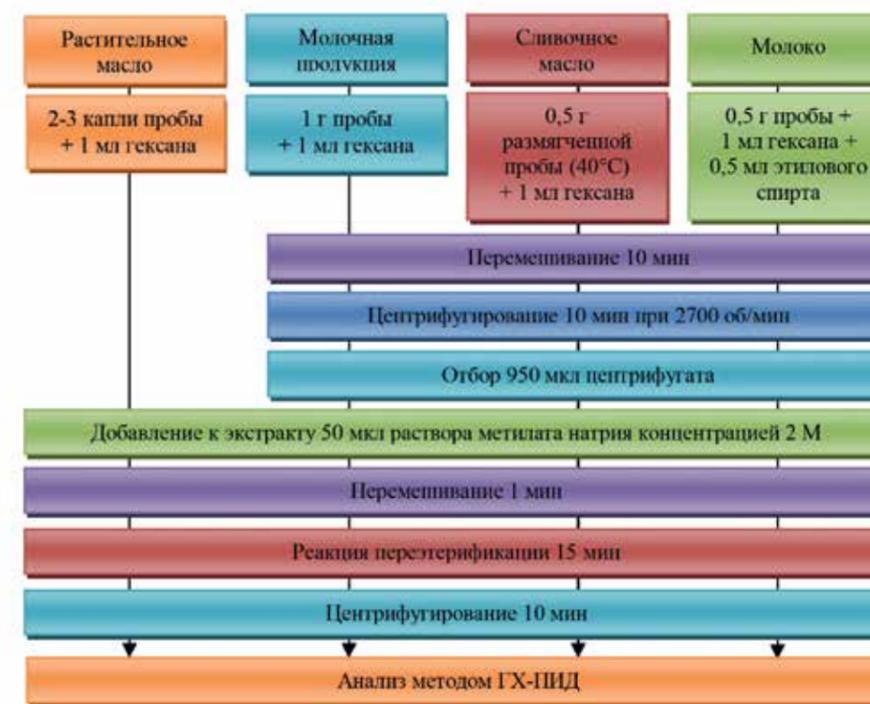


Таблица 2
Контроль качества определения жирнокислотного состава с использованием стандартных образцов Restek (n=2)

Стандартный образец	AOCS #3 (10 components)			AOCS #2 (5 components)			AOCS #4 (4 components)			AOCS #6 (7 components)			AOCS #1 (6 components)		
	Полученное значение, %	Аттестованное значение, %	Относительная ошибка, %	Полученное значение, %	Аттестованное значение, %	Относительная ошибка, %	Полученное значение, %	Аттестованное значение, %	Относительная ошибка, %	Полученное значение, %	Аттестованное значение, %	Относительная ошибка, %	Полученное значение, %	Аттестованное значение, %	Относительная ошибка, %
C _{14:0}	0,97	1,0	-3,0	6,91	7,0	-1,3	11,19	11,0	1,7	1,91	2,0	-4,5	-	-	-
C _{16:0}	4,05	4,0	1,3	4,81	5,0	-3,8	2,88	3,0	-4,0	29,83	30,0	-0,6	6,01	6,0	0,2
C _{16:1}	-	-	-	18,12	18,0	0,7	79,83	80,0	-0,2	2,91	3,0	-3,0	-	-	-
C _{18:0}	2,88	3,0	-4,0	36,26	36,0	0,7	6,10	6,0	1,7	14,02	14,0	0,1	2,91	3,0	-3,0
C _{18:1}	45,36	45,0	0,8	33,9	34,0	-0,3	-	-	-	41,34	41,0	0,8	35,2	35,0	0,6
C _{18:2}	15,2	15,0	1,3	-	-	-	-	-	-	7,05	7,0	0,7	49,89	50,0	-0,2
C _{18:3}	3,04	3,0	1,3	-	-	-	-	-	-	2,94	3,0	-2,0	3,02	3,0	0,7
C _{20:0}	2,91	3,0	-3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,97	3,0	-1,0
C _{22:0}	2,89	3,0	-3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{22:1}	19,84	20,0	-0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{24:0}	2,86	3,0	-4,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Как видно из приведенной зависимости (рис. 3), 25 мкл раствора метилата натрия недостаточно для гидролиза триглицеридов и этерификации всех выделенных жирных кислот, содержащихся в экстрагированной жировой фазе сливочного масла, что приводит к искажению результатов анализа и невозможности правильной оценки качества анализируемого продукта. С другой стороны, это крайне негативно влияет на рабочие части используемого оборудования: инжектор, капиллярную колонку и шприц для ввода пробы. 50 мкл реагента достаточно для омыления триглицеридов, содержащихся в экстракте, поскольку увеличение его объема до 200 мкл не оказывает значительного влияния на площади пиков. Однако избыточное количество метилата натрия существенно искажает форму пиков, что мешает их правильной разметке и интерпретации полученных данных. Поэтому оптимальный объем раствора метилата натрия концентрацией 2 моль/л составил 50 мкл.

Выбор времени проведения реакции этерификации. Для выбора оптимального времени реакции получения метиловых эфиров выдерживали реакционную смесь, состоящую из 950 мкл гексанового экстракта сливочного масла и 50 мкл раствора метилата натрия (2 моль/л), в течение 5, 10, 15, 20 и 30 мин при комнатной температуре. Полученная зависимость суммы площадей пиков МЭЖК от времени проведения реакции представлена на рис. 4.

Из приведенной зависимости (рис. 4) следует, что увеличение времени проведения реакции с 15 до 30 мин не приводит к существенному увеличению площадей пиков определяемых компонентов, поэтому оптимальным временем реакции получения МЭЖК является 15 мин.

Схема определения жирнокислотного состава молочной и растительной продукции приведена на схеме 2.

Контроль качества определения жирнокислотного состава с использованием стандартных и контрольных образцов. Для контроля качества проводимых исследований ЖКС растительных масел и молочной продукции предварительно оценили состав стандартных образцов растительных и животных жиров Restek. Анализ сертифицированного референтного материала необходим для оценки правильности разметки пиков, расчета массовых долей МЭЖК и интерпретации полученных данных, а также контроля стабильности работы используемого оборудования. Результаты контроля приведены в табл. 2.

Согласно данным табл. 2, относительная погрешность определения массовой доли МЭЖК стандартных образцов не превышает 5%, что позволяет проводить оценку подлинности различных видов растительных и животных жиров методом ГХ-ПИД при выбранных оптимальных условиях.

В качестве контрольных использовали образцы натурального происхождения (сырое коровье молоко) и образцы масложировой и молочной продукции с заявленным содержанием растительных жиров (продукт плавленный с сыром и продукт творожный). Результаты контроля методики с использованием положительных и отрицательных образцов приведены в табл. 3.

Результаты определения ЖКС контрольных образцов соответствуют заявленной о них информации: по значениям соотношений массовых долей МЭЖК отрицательные контрольные образцы являются натуральными молочными продуктами, положительные

Таблица 3
Контроль качества определения жирнокислотного состава с использованием контрольных образцов (n=2)

Обозначение жирной кислоты	Массовая доля метиловых эфиров жирных кислот, %					
	Отрицательный контроль		Положительный контроль			Нормативное значение [8, 12]
	Молоко коровье (образец №1)	Молоко коровье (образец №2)	Продукт творожный (м.д.ж. 18,0%)	Продукт плавный с сыром (образец №1)	Продукт плавный с сыром (образец №2)	
C _{4:0} масляная	3,0	2,7	0,1	0,05	0,05	2,0-4,2
C _{6:0} капроновая	2,2	2,0	0,1	0,07	0,04	1,5-3,0
C _{8:0} каприловая	1,4	1,4	0,3	0,2	0,04	1,0-2,0
C _{10:0} каприновая	3,4	3,4	0,9	0,1	0,06	2,0-3,5
C _{12:0} лауриновая	3,9	4,1	1,4	0,5	0,2	2,0-4,0
C _{14:0} миристиновая	12,5	12,9	5,8	1,2	1,1	8,0-13,0
C _{14:1} миристолеиновая	1,7	2,0	0,4	0,5	0,2	0,6-1,5
C _{16:0} пальмитиновая	31,8	34,1	39,9	40,9	40,8	22,0-33,0
C _{16:1} пальмитолеиновая	1,2	1,3	0,8	0,09	0,09	1,5-2,0
C _{18:0} стеариновая	11,5	9,7	10,1	4,6	4,7	9,0-13,0
C _{18:1} олеиновая	23,9	23,3	35,0	44,3	44,2	22,0-32,0
C _{18:2} линолевая	2,5	2,5	4,7	7,0	8,0	3,0-5,5
C _{18:3} линоленовая	0,7	0,5	0,1	0,1	0,2	до 1,5
C _{20:0} арахидиновая	0,2	0,1	0,3	0,3	0,33	до 0,3
C _{22:0} бегеновая	0,05	0,03	0,1	0,05	0,09	до 0,1
Соотношение метиловых эфиров жирных кислот молочного жира						
Пальмитиновой (C _{16:0}) к лауриновой (C _{12:0})	8,2	8,3	28,5	81,8	204	5,8-14,5
Стеариновой (C _{18:0}) к лауриновой (C _{12:0})	2,9	2,4	7,2	9,2	23,5	1,9-5,9
Олеиновой (C _{18:1}) к миристиновой (C _{14:0})	1,9	1,8	6,0	36,9	40,2	1,6-3,6
Линолевой (C _{18:2}) к миристиновой (C _{14:0})	0,2	0,2	0,8	5,8	7,3	0,2-0,5
Суммы олеиновой и линолевой к сумме лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой	0,4	0,4	0,7	1,1	1,1	0,4-0,7

контрольные образцы содержат жиры растительного происхождения. Приемлемые результаты контрольной процедуры дают возможность использования методики для определения фальсификации продукции.

Определение жирнокислотного состава молочных продуктов. Жировая фаза молочных продуктов должна содержать только молочный жир коровьего молока. Жирнокислотный состав молочного жира приведен в нормативной документации [2-4, 8]. В табл. 4 представлены результаты определения ЖКС некоторых молочных продуктов (сыра, шоколадного сливочного масла, сливочного масла, сметаны и творога). Фальсификацию жировой фазы молочных продуктов из коровьего молока жирами немолочного происхождения устанавливают по результатам

сравнения полученных соотношений массовых долей МЭЖК (или их сумм) с показателями, указанными в нормативных документах [8]. Если значение хотя бы одного из соотношений массовых долей МЭЖК (или их сумм) выходит за установленные границы соотношений, то это свидетельствует о фальсификации жировой фазы продуктов из коровьего молока жирами немолочного происхождения.

Всего по итогам работы было проанализировано 79 образцов молока и молочных продуктов: 10 проб сливочного масла (в том числе 1 проба шоколадного и 1 проба топленого масла), 15 проб кефира и биоюгурта; 10 проб питьевого пастеризованного молока (м.д.ж. 3,2%); 10 проб сырого коровьего молока; 4 пробы сыра; 15 проб сметаны (м.д.ж. 15, 20 и 30%); 8 проб творога (м.д.ж. 1,8; 5,0 и 18,0%); 2 пробы плавленного сыра; 4 про-

Таблица 4
Жирнокислотный состав жировой фазы молочных продуктов (n=2)

Наименование жирной кислоты	Массовая доля метиловых эфиров жирных кислот, %					Нормативное значение [8, 12]
	Сыр (образец №1) (м.д.ж. 50 %)	Сыр (образец №2) (м.д.ж. 25 %)	Сыр (образец №2) (м.д.ж. 50 %)	Масло шоколадное сливочное (м.д.ж. 62 %)	Масло крестьянское (м.д.ж. 72,5 %)	
C _{4:0} масляная	1,8	1,9	1,3	2,3	3,0	2,0-4,2
C _{6:0} капроновая	1,3	1,6	1,0	1,6	2,2	1,5-3,0
C _{8:0} каприловая	0,9	1,2	0,7	1,1	1,5	1,0-2,0
C _{10:0} каприновая	2,0	3,0	1,6	2,5	3,5	2,0-3,5
C _{12:0} лауриновая	2,5	3,8	2,2	3,8	4,3	2,0-4,0
C _{14:0} миристиновая	9,1	12,5	7,4	10,3	13,7	8,0-13,0
C _{16:0} пальмитиновая	33,7	33,9	36,3	35,5	36,8	22,0-33,0
C _{18:0} стеариновая	11,1	10,4	7,8	8,0	8,5	9,0-13,0
C _{18:1} олеиновая	31,5	29,2	34,9	29,5	23,6	22,0-32,0
C _{18:2} линолевая	5,5	2,0	6,5	4,6	2,0	3,0-5,5
C _{18:3} линоленовая	0,7	0,4	0,3	0,6	0,7	до 1,5
C _{20:0} арахиновая	0,07	0,08	0,21	0,27	0,25	до 0,3
C _{22:0} бегеновая	0,05	0,04	0,02	0,03	0,05	до 0,1
Соотношение метиловых эфиров жирных кислот молочного жира						
Пальмитиновой (C _{16:0}) к лауриновой (C _{12:0})	13,5	8,9	16,8	9,3	8,6	5,8-14,5
Стеариновой (C _{18:0}) к лауриновой (C _{12:0})	4,4	2,7	3,6	2,1	2,0	1,9-5,9
Олеиновой (C _{18:1}) к миристиновой (C _{14:0})	3,5	2,3	4,8	2,9	1,7	1,6-3,6
Линолевой (C _{18:2}) к миристиновой (C _{14:0})	0,6	0,2	0,9	0,5	0,2	0,2-0,5
Суммы олеиновой и линолевой к сумме лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой	0,7	0,5	0,8	0,6	0,4	0,4-0,7

бы продукта плавленного с сыром и 1 проба творожного продукта. Из них 15 проб не соответствовали нормативным значениям по соотношениям массовых долей МЭЖК, а значит были фальсифицированы жирами немолочного происхождения. Следует заметить, что 1 проба творожного продукта и 4 пробы плавленного продукта с сыром изготовлены с использованием заменителей молочного жира и не могут считаться фальсифицированными. Они были исследованы в качестве контрольных образцов, заведомо не соответствующих по ЖКС молочному жиру.

На рис. 5 в качестве примера представлена хроматограмма ЖКС жировой фазы образца сыра (м.д.ж. 50%).

Определение жирнокислотного состава растительных масел. При выбранных ранее оптимальных условиях гидролиза триглицеридов жировой фазы и получения МЭЖК проводили определение ЖКС различных видов растительного масла: оливкового, под-

солнечного, тыквенного и кукурузного. Результаты представлены в табл. 5.

Результаты определения ЖКС 4 образцов растительного масла из 5 исследованных расходятся с нормативными значениями [2] (с учетом погрешности измерения жирнокислотного состава в соответствии с ГОСТ 30418-96: 7–15%), что говорит о фальсификации представленных образцов.

Совпадение результатов измерения в пределах допустимой погрешности исследуемой продукции с ЖКС оливкового масла не говорит о его подлинности, так как окончательная идентичность продукции должна быть подтверждена дополнительными испытаниями, при которых кроме жирнокислотного состава должна быть установлена идентичность триглицеридного состава газохроматографическим анализом [2].

Хроматограмма исследованного образца подсолнечного масла высшего сорта приведена на рис. 6.

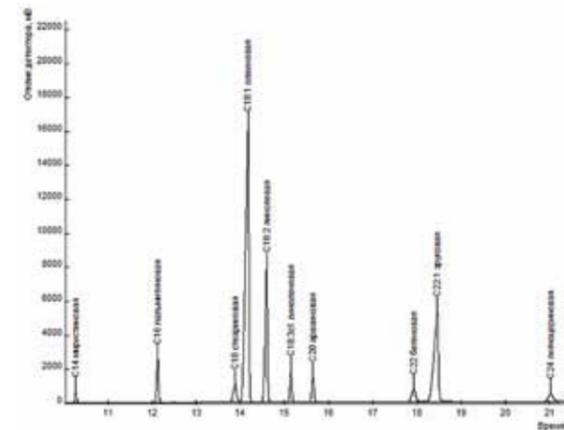


Рис. 5. Хроматограмма ЖКС жировой фазы сыра (м.д.ж. 50%)

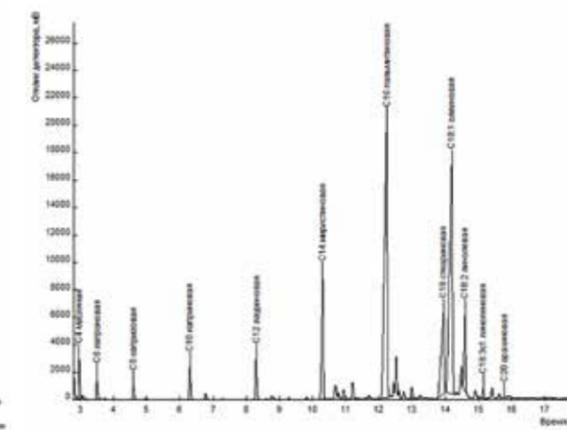


Рис. 6. Хроматограмма ЖКС жировой фазы подсолнечного масла высшего сорта

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований усовершенствована методика определения жирнокислотного состава молочной и растительной продукции (растительного масла) методом газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием, отличительной особенностью которой является совмещение стадий экстракции жировой фазы и получения производных (метиловых эфиров). Оптимизированы условия подготовки проб молока, молочных продук-

тов и растительного масла: выбран растворитель для экстракции жировой фазы продукта (гексан); объем метилата натрия (2 М), необходимый для проведения реакции этерификации (50 мкл); время проведения реакции для полного омыления триглицеридов (15 мин).

С использованием представленной методики проанализированы опытные образцы молочной продукции (79 проб) и растительного масла (5 проб), из них:

- 15 проб молочной продукции (сливочное масло, сыр, сметана, сыр плавильный, творог, молоко питьевое)

Таблица 5
Жирнокислотный состав жировой фазы растительных масел (n=2)

Обозначение жирной кислоты	Массовая доля метиловых эфиров жирных кислот, %								
	Оливковое масло	Нормативное значение [2]	Подсолнечное масло высшего сорта	Подсолнечное масло высокой очистки	Нормативное значение [2]	Тыквенное масло	Нормативное значение [2]	Кукурузное масло	Нормативное значение [2]
C _{12:0}	0,01	-	-	-	-	-	-	0,3	до 0,3
C _{14:0}	0,01	-	0,9	1,0	до 0,2	-	-	1,5	до 0,3
C _{16:0}	11,9	7,0-20,0	9,9	9,8	5,6-7,6	17,5	5,9-12,0	14,8	9,0-14,0
C _{16:1}	1,0	0,3-3,5	0,3	0,2	до 0,3	-	-	0,2	до 0,5
C _{18:0}	2,7	1,5-4,3	4,7	5,3	2,7-6,5	6,8	3,0-6,0	5,1	0,5-4,0
C _{18:1}	77,6	56,0-83,0	30,8	28,4	14,0-39,4	33,4	24,0-47,0	31,6	24,0-42,0
C _{18:2}	5,4	3,3-20,0	52,0	54,0	18,3-74,0	41,4	26,0-57,0	44,1	34,0-62,0
C _{18:3}	0,7	0,4-1,5	0,2	0,1	до 0,2	0,4	до 9,0	1,4	до 2,0
C _{20:0}	0,4	0,2-1,6	0,3	0,3	0,2-0,4	0,4	до 0,5	0,3	до 1,0
C _{20:1}	0,3	0,2-0,5	0,1	0,1	до 0,2	-	-	0,2	до 0,5
C _{22:0}	0,1	-	0,6	0,7	0,5-1,3	-	-	0,3	до 0,5
C _{22:1}	-	-	0,01	-	до 0,2	-	-	-	-
C _{22:2}	-	-	0,04	0,01	до 0,3	-	-	-	-
C _{24:0}	-	-	0,2	0,2	0,2-0,3	-	-	0,2	до 0,5

не соответствовали требованиям ГОСТ Р 52253-2004, что обусловлено наличием в составе жиров немолочного происхождения;

- 4 пробы растительного масла не соответствовали требованиям ГОСТ 30623-98.

Полученные результаты подтверждают возможность применения усовершенствованной методики в химических лабораториях для рутинного анализа проб молока, молочной и растительной продукции при определении жирнокислотного состава с целью обнаружения фальсификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ 28928-91. Заменители масла какао. Метод определения состава триглицеридов. — М.: ИПК Изд-во стандартов, 2005. — 3 с.
- ГОСТ 30623-98. Масла растительные и маргариновая продукция. Метод обнаружения фальсификации. — М.: Стандартинформ, 2010. — 16 с.
- ГОСТ 31452-2012. Сметана. Технические условия. — М.: Стандартинформ, 2013. — 9 с.
- ГОСТ 31453-2013. Творог. Технические условия. — М.: Стандартинформ, 2013. — 10 с.
- ГОСТ 31663-2012. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров жирных кислот. — М.: Стандартинформ, 2013. — 8 с.
- ГОСТ 31754-2012. Масла растительные, жиры животные и продукты их переработки. Методы определения массовой доли трансизомеров жирных кислот. — М.: Стандартинформ, 2014. — 24 с.
- ГОСТ 31979-2012. Молоко и молочные продукты. Метод обнаружения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стерингов. — М.: Стандартинформ, 2014. — 10 с.
- ГОСТ Р 52253-2004. Масло и паста масляная из коровьего молока. Общие технические условия. — М.: ИПК Изд-во стандартов, 2004. — 21 с.
- ГОСТ Р ИСО 23275-1-2013. Жиры и масла животные и растительные. Эквиваленты масла какао в масле какао и шоколаде. Часть 1. Определение наличия эквивалентов масла какао. — М.: Стандартинформ, 2014. — 19 с.
- ГОСТ Р ИСО 23275-2-2013. Жиры и масла животные и растительные. Эквиваленты масла какао в масле какао и шоколаде. Часть 2. Определение количества эквивалентов масла какао. — М.: Стандартинформ, 2014. — 15 с.
- Журавлев А.В. Трансжиры: что это такое и с чем их едят (краткий вариант). — М., 2012. — 58 с.
- МУ 4.1./4.2.2484-09. Методические указания по оценке подлинности и выявлению фальсификации молочной продукции. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 26 с.
- Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 024/2011. Технический регламент на масложировую продукцию: утв. Решением Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 г. № 883. — 37 с.
- Adlof R.O., Copes L.C., Emken E.A. Analysis of the Monoenoic Fatty Acid Distribution in Hydrogenated

Vegetable Oils by Silver-Ion High-Performance Liquid Chromatography // JAOCS. — 1995. — Vol. 72, № 5. — P. 571–574.

15. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / M. Holcapek, P. Jandera, P. Zderadicka, L. Hruby // J. Chromatogr. A. — 2003. — Vol. 1010. — P. 195–215.

16. Chemical profiling of triacylglycerols and diacylglycerols in cow milk fat by ultra-performance convergence chromatography combined with a quadrupole time-of-flight mass spectrometry / Q. Zhou, B. Gao, X. Zhang [et al.] // Food Chemistry. — 2014. — Vol. 143. — P. 199–204.

17. Determination of fatty acid profile in cow's milk using mid-infrared spectrometry: Interest of applying a variable selection by genetic algorithms before a PLS regression / M. Ferrand, B. Huquet, S. Barbey [et al.] // Chemom. Intell. Lab. Syst. — 2011. — Vol. 106, № 2. — P. 183–189.

18. Determination of free fatty acids in edible oils by ¹H NMR spectroscopy / C. Skiera, P. Steliopoulos, T. Kuballa [et al.] // J. Lipid Technology. — 2012. — Vol. 24, № 12. — P. 279–281.

19. Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography / L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada, M. Juarez // JAOCS. — 1997. — Vol. 74, № 2. — P. 131–135.

20. Determination of underivatized long chain fatty acids using RP-HPLC with capacitively coupled contactless conductivity detection / A. Makahleh, B. Saad, G. Siang [et al.] // J. Talanta. — 2010. — Vol. 81. — P. 20–24.

21. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry / H. Soyeurt, P. Dardenne, F. Dehareng [et al.] // J. Dairy Sci. — 2006. — Vol. 89, № 9. — P. 3690–3695.

22. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids / L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada [et al.] // J. Dairy Sci. — 1999. — Vol. 82. — P. 878–884.

23. Juaneda P. Utilisation of reversed-phase high-performance liquid chromatography as an alternative to silver-ion chromatography for the separation of cis- and trans-C18:1 fatty acid isomers // J. Chromatogr. A. — 2002. — Vol. 954. — P. 285–289.

24. Occurrence of trans-C18:1 fatty acid isomers in goat milk: effect of two dietary regimens / M. LeDoux, A. Rouzeau, P. Bas, D. Sauvant // J. Dairy Sci. — 2002. — Vol. 85. — P. 190–197.

25. Precht D., Molken J. Identification and quantitation of cis/trans C16:1 and C17:1 fatty acid positional isomers in German human milk lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry // European J. Lipid Sci. Technol. — 2000. — Vol. 102. — P. 102–113.

26. Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography / D.J. Fletouris, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas, A.I. Mantis // J. Dairy Sci. — 1998. — Vol. 81. — P. 2833–2840.

УДК 619.579.842.14-02

ПРОТЕОМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИИ РОДА *SALMONELLA*

Н.Б. Шадрова¹, О.В. Прунтова², Г.С. Скитович³

¹ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shadrova@arriah.ru

² руководитель Испытательного центра, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: skitovich@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты изучения протеомических свойств изолятов бактерии рода *Salmonella* методом MALDI-TOF на масс-спектрометре MALDI Autoflex III. Идентификация микроорганизмов проводилась методом прямого нанесения с последующей процедурой сравнения полученных масс-спектров с установленной в приборе базой данных. Были определены пики, характерные для многих представителей семейства *Enterobacteriaceae*, и отношение масса/заряд (m/z), характеризующее представителей рода *Salmonella*.

Ключевые слова: масс-спектрометр, MALDI-TOF, бактерии рода сальмонелла.

ВВЕДЕНИЕ

Патогенные бактерии рода сальмонелла являются одними из основных возбудителей кишечных инфекционных болезней и представляют значительную проблему для здравоохранения в развитых и развивающихся странах, вызывая пищевые токсикоинфекции. Ежегодно в мире регистрируется 1,3 млрд случаев гастроэнтерита и 3 млн летальных случаев из-за заражения сальмонеллами.

Переносчиками сальмонелл являются преимущественно сельскохозяйственные животные, кроме того, передача сальмонелл может осуществляться от животного к человеку и от человека к человеку. Основным источником заражения человека сальмонеллами являются продукты как животного, так и растительного происхождения (мясо, яйца, молочные продукты, фрукты и овощи). Современное направление в производстве пищевых продуктов, называемое «органическое» растениеводство, также повышает риск пищевых отравлений, в том числе и сальмонеллеза [1].

В последнее десятилетие, наряду с классическими и молекулярно-биологическими методами идентификации микроорганизмов, все чаще применяется метод идентификации микроорганизмов по их белковым профилям, или прямое белковое профилирование. Данный метод не уступает по таким показателям, как точность и специфичность идентификации, однако его выгодно отличают быстрота проведения и более низкая себестоимость анализов [2, 3, 9, 10].

Метод времяпролетной MALDI масс-спектрометрии (MALDI-TOF) основан на десорбции и ионизации исследуемого вещества с помощью лазерного излучения

в присутствии матрицы с последующим разделением ионов во времяпролетном масс-анализаторе. Под воздействием лазерных импульсов матрица, сокристаллизованная с исследуемым веществом, активно поглощает излучение лазера, что приводит к ее десорбции. Переходя в газовую фазу, матрица увлекает за собой молекулы исследуемого вещества, а также способствует их ионизации с образованием преимущественно однозарядных ионов [7]. Метод позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробной клетки (прямое белковое профилирование), т. е. без фракционирования и очистки отдельных белков, и получать уникальные для данного вида масс-спектры с высокой точностью и разрешением, характеризующие исследуемый объект по типу «отпечатков пальцев» [4].

Для идентификации микроорганизмов обычно используют спектры в диапазоне масс 2–20 кДа. Анализ масс-спектров *E. coli* в данном диапазоне показал, что из 2000 белков, рассчитанных на основании данных секвенированного генома *E. coli*, в спектрах присутствует только 30 [11]. Большинство полученных пиков были отнесены к рибосомальным белкам, остальные — к ДНК-связывающим белкам и белкам холодового шока. Рибосомальные белки являются достаточно консервативными, что обеспечивает их таксономическую специфичность. Помимо этого, рибосомальные белки в большом количестве присутствуют в цитоплазме клеток — до половины массы растущей клетки, а их набор остается неизменным вне зависимости от внешних условий и стадии роста, что и обеспечивает воспроизводимость масс-спектров. Исследования внутри- и меж-