

اندازه‌گیری سریع ترکیبات آلی فرار در ماست به کمک دستگاه Headspace-Gas Chromatography/Mass Spectrometry

• پرویز سلیمانی

پژوهشگاه صنعت نفت، واحد آنالیز دستگاهی
تاریخ دریافت: خردادماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۵
Email: psoleimani134 @ hotmail com

چکیده

اتصال سیستم فضای بالا سری به دستگاه کروماتوگرافی گازی و طیف سنجی جرمی، این امکان را می‌دهد که ترکیبات آلی فرار در محیط‌های مختلف نظیر خاک، آب، خون، ادرار، شیر، پنیر و به ویژه ماست را بتوان جداسازی و شناسایی نمود. نمونه‌های مختلف ماست پس از جمع آوری و آماده سازی، مورد آنالیز قرار گرفته و ترکیبات آلی فرار در آن نظیر استالدئید، استون، بوتانول و استیک اسید جداسازی و شناسایی شدند. حد تشخیص دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی بروش مشاهده یون انتخابی برای استیک اسید ($m/z = 60$) مقدار ۱۰۰ نانوگرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد. انحراف نسبی از استاندارد برای ترکیب استیک اسید ۵/۵٪ می‌باشد

کلمات کلیدی: کروماتوگرافی گازی / طیف سنجی جرمی، ترکیبات آلی فرار، مشاهده یون انتخابی، فضای بالا سری، یونیزاسیون شیمیائی، استخراج

Pajouhesh & Sazandegi No 77 pp: 124-130

Rapid determination of volatile organic compounds (VOC,s) in yogurt by Headspace-Gas chromatography/ Mass Spectrometry (HS-GC/MS)

By: Soleimani, P. Research Institute of Petroleum Industry, Analytical Dept.

Static headspace combined with gas chromatography/mass spectrometry is a powerful technique which can be used for separation and identification of volatile organic compounds in complex and different matrices such as soil, water, blood, urine, milk, cheese and especially yogurt. After sample collection, they were analyzed by HS-GC/MS system and the components (acetaldehyde, acetone, butanone and acetic acid) were detected and quantified. The limit of detection (LOD) was 100 ng/kg with selected ion monitoring (SIM) mode at $m/z = 60$ for acetic acid. The relative standard deviation (RSD) was measured at 5.5% for acetic acid.

Key Words: Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Volatile Organic Compounds (VOC,s), Selected Ion Monitoring (SIM), Headspace, Chemical Ionization, Extraction

مقدمه

شناسایی قرار گرفته که مهمترین آنها استون، استالید، دی استیل، بوتانول، استیک اسید و غیره می باشد (۷،۶،۵،۴،۳،۲،۱). روش های مختلف تجزیه ای که تاکنون برای جداسازی و شناسایی ماست به کار رفته، روش همزمان تقطیر-استخراج (۹،۸،۱۰،۱۱)، استخراج با حلال (۱۲،۱۳)، روش دمیدن گاز بی اثر و جمع کردن ترکیبات (۱۴،۱۵) و روش فضای بالاسری (۱۶،۱۷) می باشند. روش بالاسری در این پژوهش که مورد نظر می باشد، روشی سریع و قابل اعتماد بوده و برای دیگر بافت ها نیز قابل اجرا می باشد. سیستم فضای بالاسری می تواند هم به صورت دستی و هم به صورت اتوماتیک عمل نماید.

جداسازی و شناسایی ترکیبات آلی فرار در بافت های مختلف نظیر آب، خاک، خون، شیر، ادرار و لبنیات از مسائل روز تجزیه ای می باشد. به علت فراریت و سبک بودن ترکیبات آلی فرار، استخراج و آنالیز آن ها همیشه با مشکلاتی همراه بوده است. از طرفی، شناسایی بعضی از ترکیبات آلی فرار به دلیل سمی بودن و خطرات زیست محیطی که دارند با اهمیت می باشد. جداسازی و شناسایی ترکیبات آلی فرار در لبنیات مخصوصاً ماست به علت مسائل بهداشتی و سلامتی از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. از طرفی هر چه روشهای استخراج و دستگاه های به کار رفته در این زمینه دارای دقت و صحت بالائی باشند نتایج به دست آمده از اهمیت و ارزش بالائی برخوردار خواهند بود. تا کنون ترکیبات زیادی در ماست مورد

مواد و روش ها

از قرار دادن نمونه و بستن درب آن، ظرف محتوی نمونه در حمام آب گرم ۸۰ درجه قرار داده می شود. تمام مواد شیمیائی، حلال ها، معرف ها و استانداردهای ترکیبات استون، استالید، بوتانول و استیک اسید با درجه خلوص بالا (۹۹٪) از شرکت آلدریج تهیه گردیده اند. گاز هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹٪ به عنوان گاز حامل برای آنالیز ترکیبات با دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی از شرکت محصولات هوایی (Air Products) انگلیس تهیه شده است. حجم ظرف بکار رفته برای سیستم بالا سری ۲۰ میلی لیتر می باشد. دستگاه کروماتوگراف گازی - طیف سنج جرمی که برای آنالیز نمونه ها به کار برده شد از نوع تله یونی و مدل آن زحل ۲ (Saturn II) می باشد. دستگاه کروماتوگراف گازی مدل ۳۴۰۰ ساخت کارخانه واریان (Varian) می باشد. گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۲ میلی لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. ستون موئین

در این روش ظرفهای مخصوصی با حجم های ۲۲-۵ میلی لیتر انتخاب گردیده که در آن ماده مورد نظر قرار داده می شود، سپس درب آن را با وسیله مخصوص (Crimpper) محکم بسته، به طوریکه هیچ نشست ملکولی در آن مشاهده نگردد. لازم به ذکر است که حجم ظرف که نمونه داخل آن قرار می گیرد با اهمیت خواهد بود. کاربرانی که در این زمینه کار کرده اند ظروف شیشه ای بروسیلیکات با حجم ۲۲-۵ میلی لیتر را توصیه می نمایند که به طور تجاری از طرف فروشندگان قابل تهیه می باشد. این نکته ضروری است که ظروف باید کاملاً تمیز و عاری از هر نوع آلودگی باشد. در نتیجه، قبل از استفاده باید با حلال های توصیه شده و مناسب (استون، متانول و دی کلرومتان) شستشو داده شود و سپس در گرمخانه (دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد) نگهداری تا کاملاً خشک گردند. بعد

جدول ۱: غلظت و انحراف نسبی ترکیبات شناسائی شده

نام ترکیبات	غلظت (میلی گرم بر کیلوگرم)	انحراف نسبی از استاندارد (%)
استالدئید	۱/۱۸	۳/۵
استون	۱/۶۹	۴/۸
پوتانون	۳/۸	۴/۲۲
استیک اسید	۴/۸	۵/۵

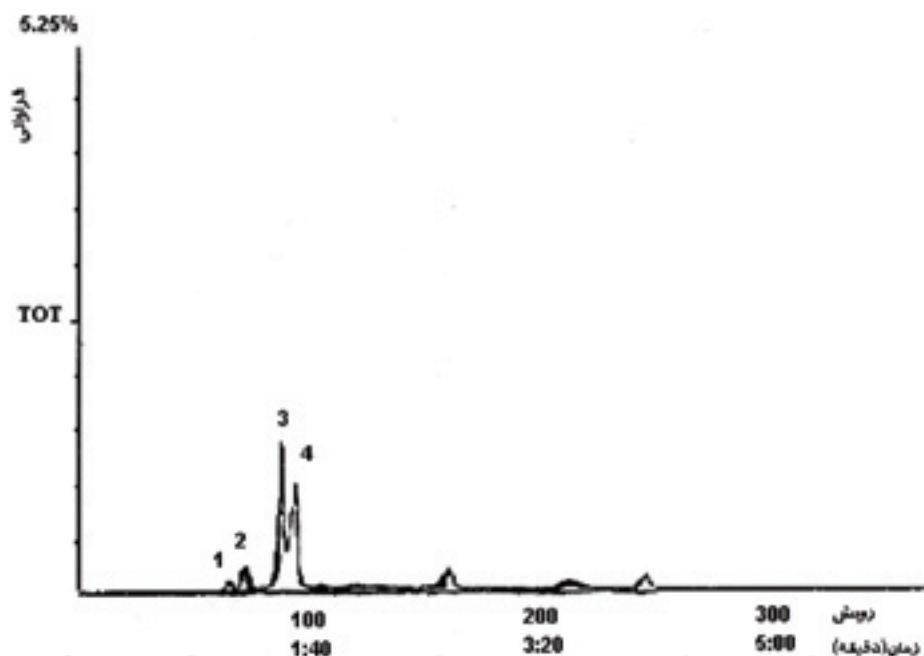
است در دماهای بالا تجزیه شوند. نکته مهم دیگر اینکه در صورت افزایش درجه حرارت سیستم فضای بالاسری، ممکن است ملکول‌های بافت نمونه (آب) تبخیر شده و به همراه دیگر ترکیبات آلی وارد ستون کروماتوگرافی گازی می‌شوند که باعث از بین رفتن و خراب شدن فاز ساکن ستون کروماتوگرافی گازی می‌گردد.

ترکیبات آلی فرار موجود در ماست، ترکیباتی هستند که نسبتاً قطبی بوده و به علت فراریت آن‌ها، جداسازی آن‌ها به روش‌های متداول نظیر استخراج مایع _ مایع مشکل می‌باشد. به عبارت دیگر، ممکن است که ترکیبات زیادی در حین استخراج از دست بروند. لذا انتخاب روش تجزیه‌ای مناسب از اهمیت خاصی برخوردار است. از طرفی، محیط این گونه ترکیبات آب بوده که خود نیز مشکل مضاعفی را در بردارد، چون ترکیبات آلی همراه با آب مجاز به تزریق مستقیم داخل ستون‌های موئین کروماتوگرافی گازی نمی‌باشند. بنابراین، ابتدا باید سیستم جداسازی ترکیبات مورد بررسی قرار گیرد که در این آزمایش سیستم فضای بالا سری انتخاب و نمونه‌ها به کمک آن مورد جداسازی قرار گرفته‌اند. یکی از مزایای سیستم فضای بالا سری سادگی، سهولت کار کردن و نسبتاً ارزان بودن آن می‌باشد. نکته مهم در سیستم فضای بالاسری، تنظیم درجه حرارت و زمان تعادل می‌باشد که در این آزمایش درجه حرارت ۸۵-۸۰ درجه سانتیگراد و زمان تعادل ۲۰ دقیقه برای تمام ترکیبات بکار رفته است. لازم بذکر است که درجه حرارت ظرف نباید از دمای تبخیر آب (۹۵ درجه) افزایش یابد، چون در این حالت ممکن است بخارات آب همراه ترکیبات آلی فرار به ستون کروماتوگرافی منتقل گردند که این عمل باعث خراب شدن ستون کروماتوگرافی گازی می‌گردد. این نکته هنگامی مشهود است که برای جداسازی ترکیبات آلی بسیار فرار از سیستم سرمائی (دمای زیر محیط) استفاده گردد. بعد از اینکه ترکیبات از محیط مربوطه رها شدند و به فاز گازی منتقل گشتند، سپس به کمک سرنگ مخصوص گازی، وارد سیستم کروماتوگرافی گازی می‌گردند تا ترکیبات فرار بطور انفرادی مورد جداسازی کامل قرار گیرند. بدیهی است که اکثر ترکیبات فرار، نقاط جوش نزدیک بهم دارند. بنابراین، جداسازی آن‌ها مشکل می‌باشد. لذا برای جداسازی آن‌ها بهتر است که در دماهای زیر محیط صورت گیرد، که این عمل با نیتروژن مایع و یا دی اکسید کربن مایع انجام پذیر

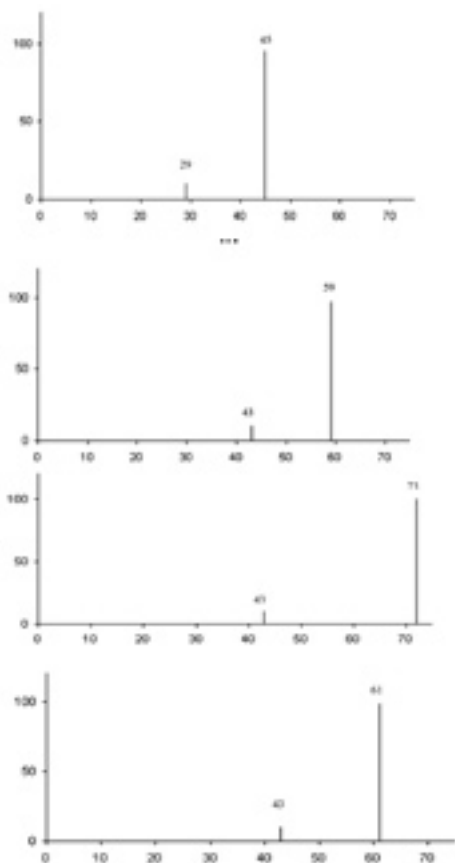
DB-۱ به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرون برای جداسازی ترکیبات استفاده گردید. شرایط دما برنامه‌ای از ۳۳ درجه سانتیگراد شروع و به ۲۸۰ درجه سانتیگراد ختم گردید. ۵ دقیقه توقف در دمای اولیه (۳۳ درجه) سپس با سرعت ۱۰ درجه بر دقیقه به دمای نهایی ختم می‌گردد. محل تزریق از نوع بدون تقسیم بوده و مقدار ۰/۴ دقیقه برای آن در نظر گرفته شده است. دستگاه طیف سنج جرمی تله یونی با سرعت طیف نگاری ۱ ثانیه و محدوده جرمی ۴۰۰-۳۳ دالتون را طی می‌نماید. ماده کالیبراسیون دستگاه طیف سنج جرمی ترکیب پر فلوروتری بوتیل آمین (FC-۴۳) که همراه دستگاه طیف سنج جرمی ارسال شده بود برای تنظیم و کالیبره کردن دستگاه استفاده گردید. درجه حرارت منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتیگراد و انرژی الکترون‌ها ۷۰ الکترون ولت و انرژی آشکار ساز ۲۰۰۰ ولت تنظیم شده است. دمای تنظیم شده برای سیستم فضای بالا سری ۸۵ درجه سانتیگراد و زمان تعادل ۲۰ دقیقه در نظر گرفته شده است. برای انتقال ترکیبات گازی از ظروف محتوی نمونه به دستگاه کروماتوگرافی گازی، سرنگ مخصوص (Gas Tight) بکار گرفته شد.

نتایج

تأثیر اضافه کردن نمک به محلول مورد آزمایش بسیار حائز اهمیت و قابل توجه می‌باشد. در صورتیکه محلول آبی شامل چند قسمت در میلیون (ppm) هیدروکربن‌های هالوژنه باشد، اضافه کردن نمک به مقدار ۰/۵ گرم تأثیر به سزائی روی جداسازی ترکیبات دارد. برای مثال، اضافه کردن ۲۰ گرم سولفات سدیم به محلول آبی که حاوی ۲۶۰ قسمت در بیلیون ترکیب تری کلرواتیلن بوده، پیک ترکیب مربوطه به اندازه ۱۹/۳٪ افزایش می‌یابد (۳). بطور کلی اضافه کردن نمک باعث افزایش حساسیت سیستم فضای بالاسری می‌گردد و این افزایش حساسیت عمدتاً به ترکیبات قطبی مربوط می‌گردد. یکی دیگر از عوامل تأثیر گذار بر سیستم فضای بالا سری، درجه حرارت می‌باشد. با آزمایشات انجام شده این نتیجه بدست آمده که بین دماهای ۴۰-۵۰ و ۶۰-۷۰ درجه سانتیگراد بالاترین حساسیت به دمای ۸۰ درجه مربوط می‌شود. این نکته ضروری است که برخی ترکیبات قطبی ممکن

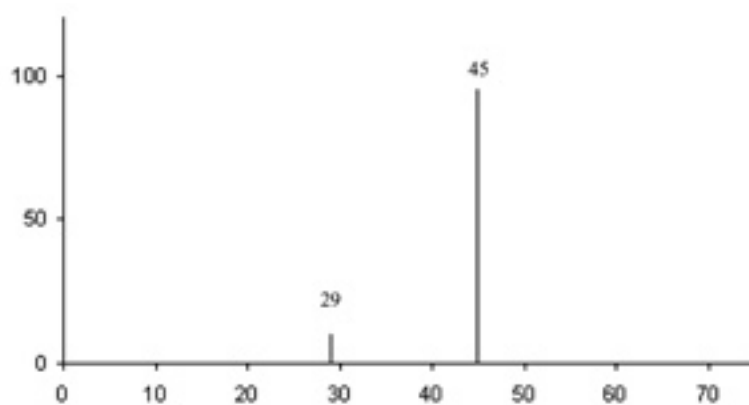


شکل ۱: کروماتوگرام کلی ترکیبات استخراج شده

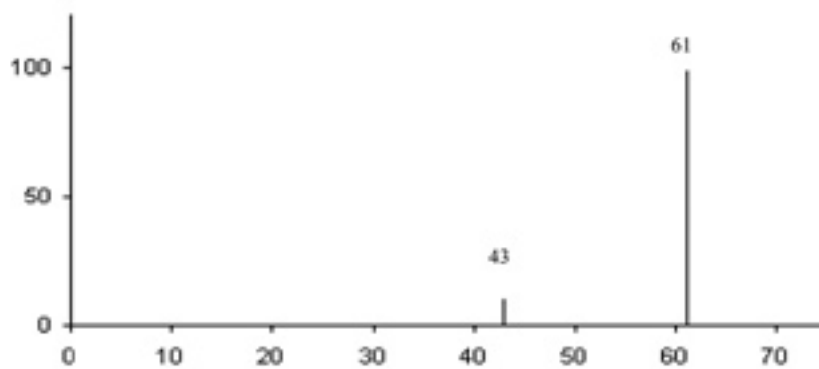
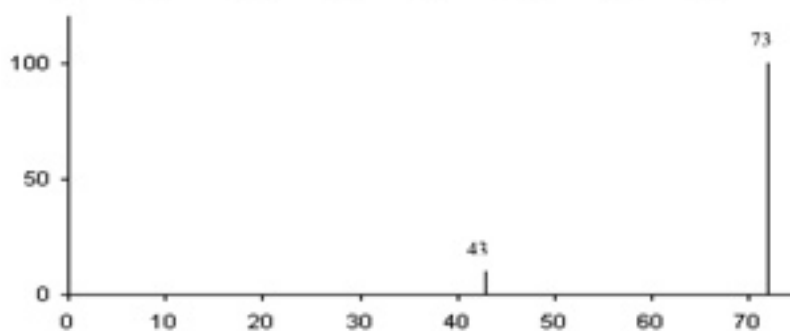
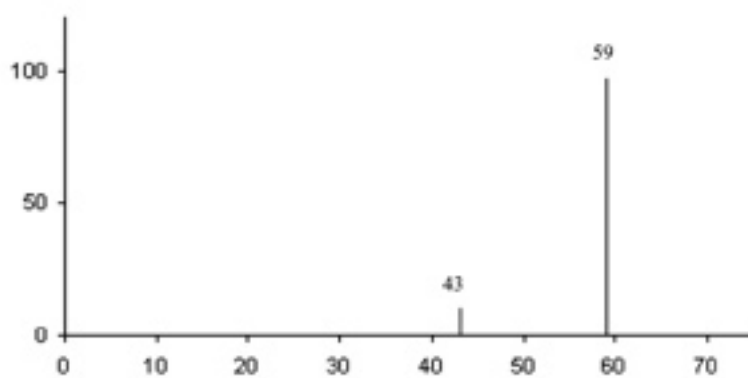


است. در صورتیکه استاندارد همه ترکیبات موجود باشد، میتوان به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی عمل جداسازی و شناسایی را انجام داد که در این حالت نیازی به دستگاه طیف سنج جرمی نمی‌باشد. اما وقتی زمان بازداری بعضی ترکیبات با یکدیگر برابر باشند، در این حالت شناسایی ترکیبات مشکل بوده که در این صورت می‌توان از روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی استفاده نمود. چون هر ترکیب شیمیایی با توجه به نوع شکست آن می‌توان از یکدیگر شناسایی شوند. از طرفی باید توجه داشت که دستگاه‌های طیف سنج جرمی جدید مجهز به کتابخانه‌های اختصاصی و قابل جستجو می‌باشند. شکل ۱ کروماتوگرام کلی ترکیبات استخراج شده بوسیله سیستم فضای بالاسری را نشان می‌دهد. بدیهی است که هر یک از ترکیبات شناسایی شده دارای زمان بازداری (Retention Time) و شماره رویش (Scan) خاص خود می‌باشند. به عبارت دیگر، ترکیبات به لحاظ داشتن نقاط جوش و قطبیت متفاوت دارای زمان بازداری متفاوتی خواهند بود.

شکل ۲: طیف‌های جرمی بروش بیماران الکترونی (الف) استالئید (ب) استون (ج) ۲- بوتانول (د) استیک اسید



...



شکل ۳: طیف جرمی یونیزاسیون شیمیائی (الف) استالید (ب) استون (ج) ۲-بوتانول (د) استیک اسید

از طرفی هر یک از ترکیبات شناسایی شده دارای طیف جرمی اختصاصی می‌باشند. شکل ۲ طیف جرمی ترکیبات استالدئید، استون، بوتانون و استیک اسید به روش یونیزاسیون بمباران الکترونی را نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که طیف جرمی ترکیبات فوق به روش بمباران الکترونی (Electron Bombardment) با انرژی ۷۰ الکترون ولت تهیه شده است. این نکته ضروری است که بعضی از ترکیبات آلی به دلیل عدم پایداری یون ملکولی (یون مادر) جرم ملکولی مورد نظر را ظاهر نمی‌کنند. در شکل ۲- الف طیف جرمی استالدئید را نشان می‌دهد که یون ملکولی آن دارای $m/z = 44$ بوده که به یون CH_3CHO^+ مربوط می‌گردد. همچنین پیک پایه آن ۲۹ بوده که از یون عامل آلدئیدی CHO^+ بدست آمده است. انتظار این است که طیف جرمی یونیزاسیون شیمیایی استالدئید پیک ۴۵ را با شدت زیاد ظاهر نماید که همین عمل نیز اتفاق افتاده و در شکل ۳- الف مشهود است. پیک در جرم ۴۵ به یون ملکولی پروتونه شده CH_3CHO^+ مربوط می‌گردد.

بحث و نتیجه‌گیری

روش فضای بالاسری که به سیستم کروماتوگرافی گازی و طیف سنجی جرمی متصل می‌باشد وسیله مناسبی برای استخراج، جداسازی و شناسایی ترکیبات فرار در محیط‌های مختلف نظیر آب، خاک، خون، شیر ادرار، لبنیات و مخلوط‌های پیچیده می‌باشد.

۱- توصیه می‌شود که از روش سیستم فضای بالاسری اتوماتیک استفاده نموده چون اتوماتیک بودن سیستم فضای بالاسری در تکرار پذیری آزمایشات نقش مهمی دارد.

۲- ترکیباتی که نفاط جوش آن‌ها زیاد و فراریت آن‌ها کم می‌باشد این روش مناسب نمی‌باشد.

۳- اضافه کردن نمک به محلول مورد نظر کمک زیادی جهت استخراج ترکیبات مورد آنالیز می‌نماید

۴- روش سیستم فضای بالا سری روشی سریع، ساده، از لحاظ قیمت مناسب و براحتی قابل اجرا در همه آزمایشگاه‌ها می‌باشد.

۵- در این روش حلال مورد استفاده قرار نمی‌گیرد بنابراین به لحاظ زیست محیطی روشی مناسب می‌باشد.

منابع مورد استفاده

- 1- A. M. Gaafar. 1992; Volatile flavour compounds of yogurt. Int. J. J. Food Sci. and Technol. 56:87-91.
- 2-B.Gosheva.1984;The organoleptic and gas chromatographic characteristics of the flavour of Bulgarian yogurt.Khranitelna Promishlenost.33:36-38.
- 3-B.Kolb,L,S.Ettre, 1997; Static head space gas chromatography theory and practice, pp7-9.
- 4-D.J.Manning and C.Moore, 1979; Headspace analysis of hard cheeses J.DairyRes 46:539-545.
- 5-G.Arora,F.Cormier, and B.Lee,1979;Analysis of odor-active volatiles in cheddar cheese headspace by multidimensional GC/MS sniffing.J.Agric.Food Chem.43:539-45.
- 6-H.Averinga,E.H.Verbug,and J.Stadhouder,1984;Determination of diacetyl in dairy products containing α -acetic acid.Neth.Milk Dairy J.38:251-62.
- 7-H.C.Dunn and R.C.Lindsay,1985; Comparison of methods for the analysis of higher boiling flavour compounds in cheddar cheese aroma.J.Dairy ,Sci.68:2853-53.
- 8-H.T.Badings and R.Neeter,1980;Recent advances in the study of aroma compound of milk and dairy products.Neth.Milk Dairy J.34:9-30.
- 9-J.C.Lin and I.J.Jeon,1985;Headspace gas sampling/GC method for the quantitative analysis of volatile compounds in

برای اینکه از جرم ملکولی مورد نظر ($m/z = 58$) اطمینان حاصل شود، روش یونیزاسیون شیمیایی (Chemical Ionization) توصیه می‌گردد. در روش یونیزاسیون شیمیایی ابتدا گاز واکنشگر (متان، ایزوبوتان و آمونیاک) تحت شرایط خاص یونیزه گشته و بدنبال آن یک سری یون‌های فعال به صورت پلاسمایی تشکیل می‌گردند که یون‌های فعال تشکیل شده با ملکول‌های نمونه در فاز گاز وارد واکنش شده، در نتیجه ملکول‌های نمونه پروتونه ($M+1$) شده و جرم ملکولی مورد نظر یک واحد جرمی بیشتر ظاهر خواهد شد. توصیه می‌شود که عمل یونیزاسیون شیمیایی در دمای پائین‌تر از دمای روش بمباران الکترونی صورت گیرد، چون درجه حرارت می‌تواند به شکست بیشتر ملکول به انجامد. شکل ۳-ب طیف جرمی یونیزاسیون شیمیایی استون را با گاز واکنشگر ایزوبوتان نشان می‌دهد. در شکل ۳- ب پیک پایه $m/z = 59$ به یون ملکولی پروتونه شده یعنی ($M+1$) مربوط می‌گردد و بقیه یون‌ها با شدت‌های کمتری ظاهر خواهند شد. بهترین طیف یونیزاسیون شیمیایی آن است که یون ملکولی دارای شدت زیاد و بقیه یون‌ها اصلاً ظاهر نشده و یا اینکه شدت آن‌ها بسیار کم باشد.

لازم به ذکر است که در طیف یونیزاسیون شیمیایی، پیک $M+1$ همیشه از بالاترین شدت برخوردار می‌باشد. انتظار این است که طیف جرمی یونیزاسیون شیمیایی استالدئید پیک ۴۵ را با شدت زیاد ظاهر نماید که همین عمل نیز اتفاق افتاده و در شکل ۳- الف مشهود است. پیک در جرم ۴۵ به یون ملکولی پروتونه شده $(CH_3CHO + 1)^+$ مربوط می‌گردد. همچنین شکل ۲- ج طیف جرمی بمباران الکترونی بوتانون را نشان می‌دهد که پیک پایه آن $m/z = 43$ و یون ملکولی آن $m/z = 72$ می‌باشد. شکل ۳- ج طیف جرمی یونیزاسیون شیمیایی ترکیب بوتانون را نشان می‌دهد. پیک در جرم ۷۳ به پروتونه شدن یون ملکولی $(C_4H_8COCH_3)^+$ مربوط می‌گردد و دارای بالاترین شدت نیز خواهد بود. شکل ۲- د طیف جرمی ترکیب استیک اسید را با جرم ملکولی $m/z = 60$ و پیک پایه $m/z = 43$ که بروش بمباران الکترونی انجام شده نشان می‌دهد. پیک پایه در

cheese. *J. Food Sci.* 50:843-44.

10- J. Huenholtz and M. J. C. Starrenburg, 1992; Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and

Leuconostoc spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:17-25.

11- L. Alonso, M. J. Fraga, 2001; Simple and Rapid analysis for quantitation of the most important volatile flavour compounds in yogurt by headspace gas chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 39: jul.

12- M. Careri, P. Manini, S. Spagnoli, G. Barbieri, and L. Bolzoni, 1994; Use of simultaneous distillation-extraction and dynamic headspace methods in the gas chromatographic analysis of Parmesan cheeses volatile components. *Chromatographia* 38:386-94.

13- M. De Fruts, J. Sanz, and I. Martinez - Casto, 1991;

Characterization of artisanal cheeses by GC and GC/MS analysis of their medium volatility fraction. *J. Agric. Food Chem.* 39:524-30.

14- M. Kondratenko and B. Gosheva, 1978; Variation in the volatile components of yogurt. In xx International Dairy Congress. Paris, France, PP. 297-98.

15- P. Vandewweghe and G. A. Reineccius, 1990; Comparison of flavour isolation techniques applied to Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 38:1549-52.

16- R. Marsili, 1985; Monitoring chemical changes in Cheddar cheese during aging by high-performance liquid chromatography and gas chromatography techniques. *J. Dairy Sci.* 68:3155-61.

17- T. Aishima and S. Nakai, 1987; Pattern recognition of GC profiles for classification of cheese variety. *J. Food Sci.* 52:939-49.



Archive of SID