APP NOTE-14/2020GCMS



Определение содержания холекальциферола (витамина D_3) в молоке методом газовой хромато-масс-спектрометрии с помощью системы **«Маэстро-αMS»**.

Колунтаев Д. А. *к. б. н., научный сотрудник отдела исследований и разработок,* ***ООО Интерлаб****, Россия, Москва*

Ключевые слова

Газовая хромато-масс-спектрометрия, холекальциферол, витамин D_3, молоко, дериватизация MSTFA, iDwell®Time, FlexibleSIM.

Резюме

Продемонстрирована возможность хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC для количественного определения жирорастворимого витамина D_3 (холекальциферола) в молоке.

Введение

Главное назначение витамина D в организме человека — обеспечение всасывания кальция в кишечнике и реабсорбция фосфора в почечных канальцах, нормализация образования костного скелета и зубов у детей, а также обеспечение сохранности строения костей. Витамин D повышает проницаемость клеточных и митохондриальных мембран кишечного эпителия, облегчая чрезмембранный транспорт катионов кальция и других двухвалентных катионов, активирует вторичное всасывание фосфатов, увеличивает захват этих ионов костной тканью, усиливает процесс оссификации.

К группе витамина D относится шесть стеринов (витамины D_1, D_2, D_3, D_4, D_5 и D_6), при этом ключевую роль в организме человека играют два из них: витамин D_2 — эргокальциферол и **витамин D_3 — холекальциферол.** Эргокальциферол (D_2) образуется в клетках растений из эргостерола и может поступать в организм человека только с пищей или с пищевыми добавками. Холекальциферол (D_3) в основном синтезируется у человека в коже под действием ультрафиолетовых лучей диапазона «B» (UVB, 280—315 нм) и также может поступать с продуктами животного происхождения [1].

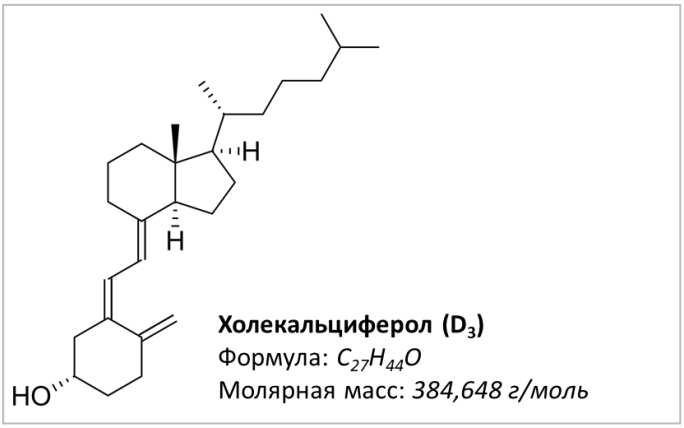


Рис. 1. *Структурная формула витамина D_3 (холекальциферол)*

Недавние исследования показали, что организм человека может не производить достаточного количества витамина D_3 только от воздействия солнечного света, поэтому очень важно дополнять потребление витамина через пищу [2]. В 2016 году Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) были пересмотрены правила маркировки пищевых продуктов. Таким образом, ведомство добилось чёткого указания и информирования потенциальных клиентов о содержании витамина D_3 на продуктовых этикетках [3]. Изменения в правилах маркировки были направлены исключительно на повышение осведомленности потребителей о витамине D_3 [4].

Применяемый в настоящее время метод для анализа витамина D_3 с помощью жидкостной хроматографии с УФ-детектором включает в себя стадии твёрдо-фазной экстракции, очистки и многократное концентрирование пробы. В таком исполнении метода наиболее сложным аспектом анализа является присутствие разнообразных интерферирующих сигналов матрицы, в частности, большое количество липидоподобных соединений, соэкстрагируемых совместно с витамином D_3 (даже после обширной очистки образца), всё ещё могут проявляться в виде многочисленных химических интерференций,

которые совместно элюируются с холекальциферолом и могут помешать его количественному определению [4].

Настоящая работа посвящена разработке нового метода рутинного анализа витамина D_3 в молоке с помощью моноквадрупольной хромато-масс-спектрометрической системы «Маэстро-αMC» (ГХ/МС).

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Все используемые в эксперименте реагенты имели классификацию как особо чистые или HPLC grade. Стандарт действующего вещества холекальциферола имел чистоту не менее 99,5%. В качестве объекта исследования были выбраны два типа молока из местного супермаркета, в частности молоко «витаминизированное» (*образец #1, безлактозное, жирность молока 1,5%*) и молоко (*образец #2, жирность молока 1,8%*), не имеющее специальной маркировки о дополнительном внесение витамина D_3.

Для построения градуировочной зависимости использовали следующие точки концентраций: 0,022, 0,055, 0,11, 0,22, 0,55, 1,1 ppm (нг/мкл).

Табл. 1. *Параметры инструментального метода.*

Оборудование	
ГХ-МС система	Interlab «Маэстро-αMS»
Испаритель	Split/Splitless (liner: Restek 4 mm x 6,3 x 78,5)
Хроматографическая колонка	Rtx-5MS (30m x 0,25mm; 250um)
Параметры хроматографического разделения	
Объём пробы	1,0 мкл
Режим испарителя	Splitless; Purge 50 мл/мин после 1,0 мин
T° испарителя	280°C
Режим работы испарителя	Режим Constant Flow
Градиент t° печи	120°C в течение 1,0 мин; 15,0°C/мин до 300°C, удержание 7,0 мин;
Скорость газа-носителя	(He) 1,0 мл/мин
T° интерфейса МС	250°C
Параметры детектирования	
Источник ионизации	*ЭИ (EI)*
T° источника	230°C
Задержка растворителя	12,0 мин
Режимы сканирования	*SCAN 50 – 500 Да*
	SIM (параметры указаны ниже)
Параметр Dwell Time	62 мсек/ион (5 спектров/сек)

Общая схема метода

Аликвоту 200 мкл молока помещали в колбу из тёмного стекла объёмом не менее 4 мл, к аликвоте добавляли 200 мкл ацетонитрила для осаждения белков и помещали в холодильную камеру на 10 мин (температуре <4°C). Далее к охлаждённой смеси добавляли 1,0 мл гексана, после чего полученную биполярную смесь интенсивно встряхивали на

лабораторном вортексе. Для улучшения перемешивания дополнительно использовали орбитальный шейкер в течение 5 минут при скорости вращения 220 RPM.

По завершении стадии экстракции смесь центрифугировали в течение 5 минут при скорости 3500 об/мин. 0,7 мл гексана (верхний слой) отбирали в отдельную виалу. Отобранную аликвоту гексана высушивали с помощью термостата при температуре 69°C в течение 40 мин.

Дериватизация

К высушенному остатку добавляли 50 мкл силилирующего реагента (100% MSTFA + 0.2% NH_4I, v/w), после чего виалу помещали в термостат при 60°C в течение 40 мин. Полученный дериват инжектировали в хроматограф в объёме 1,0 мкл. Использованные параметры инструментального метода представлены в таблице 1.

Табл. 2. Времена элюирования искомых пиков целевых ионов и параметры их сканирования.

#	Действующее вещество	*Главный ион (Quant)*	Подтвержд. ион (Qual-1)	Подтвержд. ион (Qual-2)	Время элюирования
1	Холекальциферол (D_3)	351,1	366,2	456,3	14,83 мин

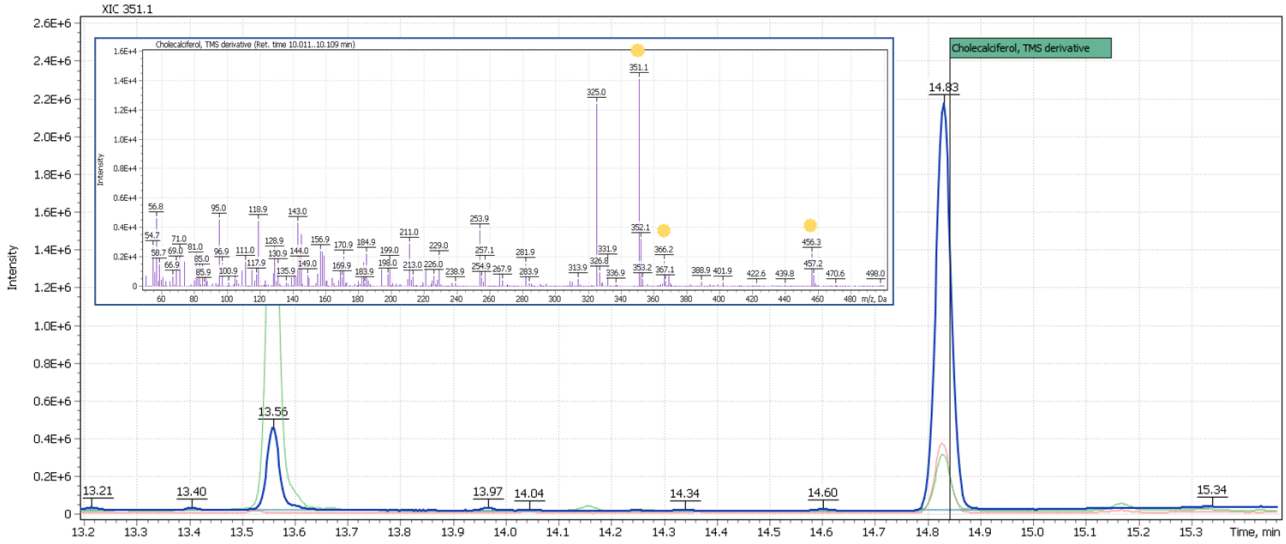


Рис. 2. Модельная хроматограмма дериватизированного стандарта холекальциферола (концентрация стандарта 0,55 ppm (SIM)) и его масс-спектр (SCAN, концентрация 22,0 ppm).

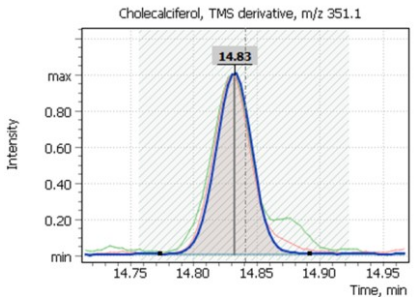
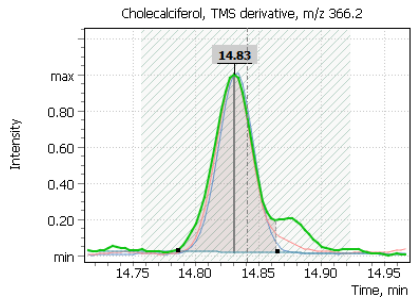
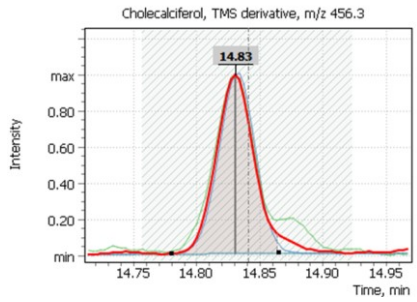
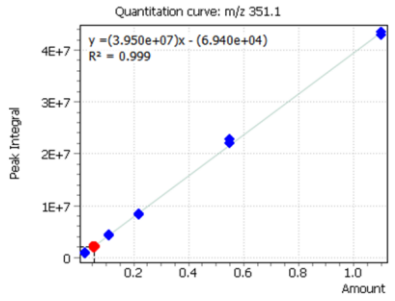
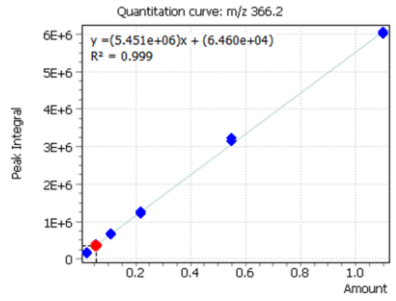
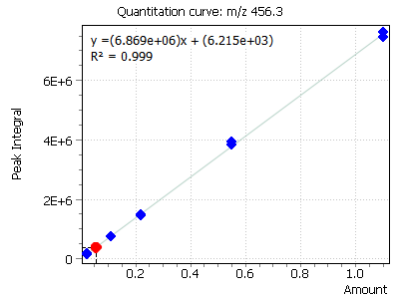
Результаты и обсуждение

Количественное определение холекальциферола проводили с использованием калибровки по внешнему стандарту. Для построения калибровочной зависимости использовали шесть калибровочных уровней, при этом за счёт использования алгоритма «*Flexible SIM*» калибровочные кривые автоматически были построены для всех целевых ионов, что наглядно продемонстрировано на рисунке 3. Коэффициенты корреляции для всех ионов составляли $R^2 \geq 0{,}999$.

Инновационный алгоритм «*Flexible SIM*» позволяет эксперту выбирать оптимальный главный ион для выполнения количественного анализа уже после сбора масс-спектрометрических данных. В частности на рисунке 3 наглядно представлено, что алгоритм автоматически интегрирует и строит калибровочные зависимости для всех ионов, участвующих в идентификации целевого соединения в методе. Таким образом, эксперт

получает возможность переключения с одного иона на другой в контексте полученных данных, а также возможность самостоятельно выбрать оптимальный ион в экстрактах сложных матриц за счёт изменения главного (количественного) ионов [5]. Очевидно, что алгоритм пост-процессинга данных *«Flexible SIM»* способен не только исключать дополнительную затрату времени на повторные эксперименты, но и оказывать методическую поддержку эксперту в процессе выбора структурно-характеристичных ионов для разработки инструментального метода сканирования и выполнения последующих анализов.

Рис. 3. Линейные зависимости и сигналы целевых ионов холекальциферола.

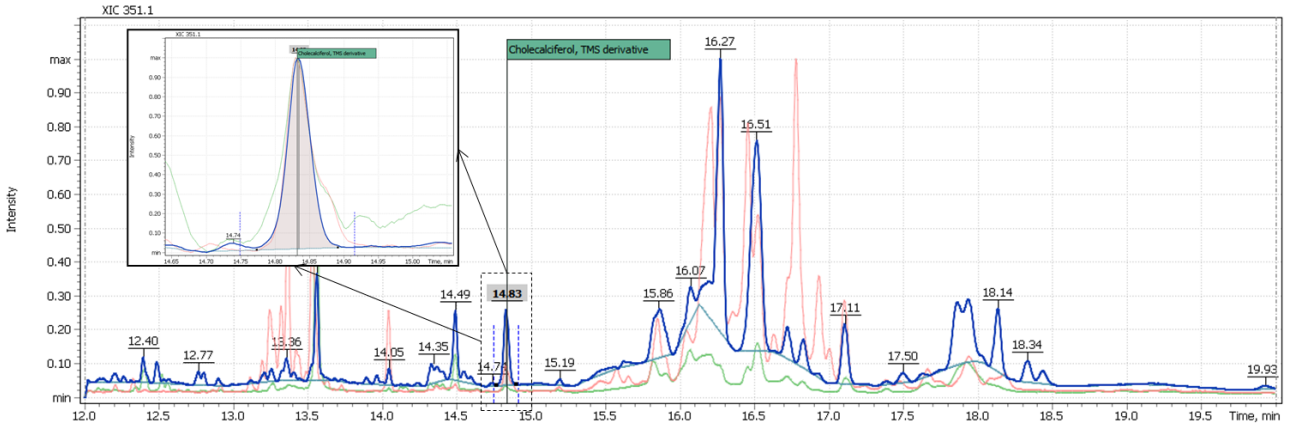
m/z 351.1 Da	*m/z 366.2 Da*	*m/z 456.3 Da*
- Концентрация сигнала 0,055 ppm		
		
R^2 = 0.999	*R^2 = 0.999*	*R^2 = 0.999*
		

Практическая оценка применимости метода

Метод рутинного анализа витамина D_3 в молоке с помощью моноквадрупольной хромато-масс-спектрометрической системы «Маэстро-αMC» апробирован на образцах молока двух типов. В образце витаминизированного молока (***Прим.*** *согласно нормировке продукции содержание витамина D_3 составляет 2 мкг/100 мл продукта*) было надёжно зафиксировано содержание витамина D_3. Его концентрация соответствовала указанной концентрации на упаковочной таре молока:

- 0,0737 ppm (нг/мкл), что соответствует (согласно объёму пробы принятой к эксперименту) 2 мкг/100 мл продукции.

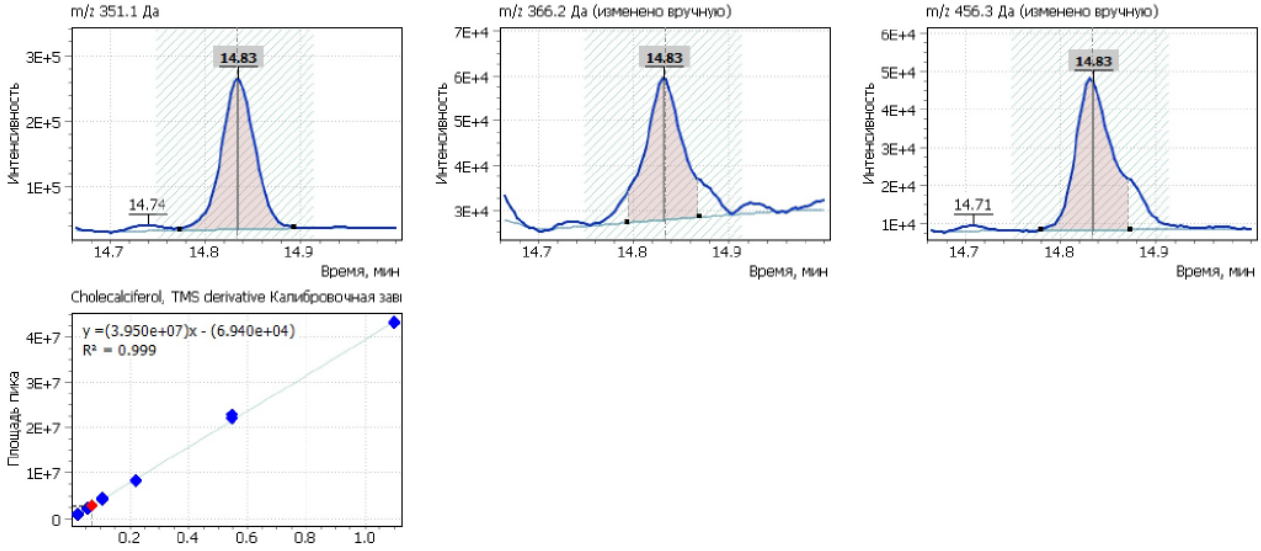
Рис. 4. Масс-хроматограмма TIC (SIM) витаминизированного молока (образец #1) и вариант отчёта количественного анализа в программном обеспечении Маэстро-αMC.



Вещество:	Cholecalciferol, TMS derivative	**Время выхода:**	14.832 мин +/-5.00 с	**Результат:**	0.0737 ppm

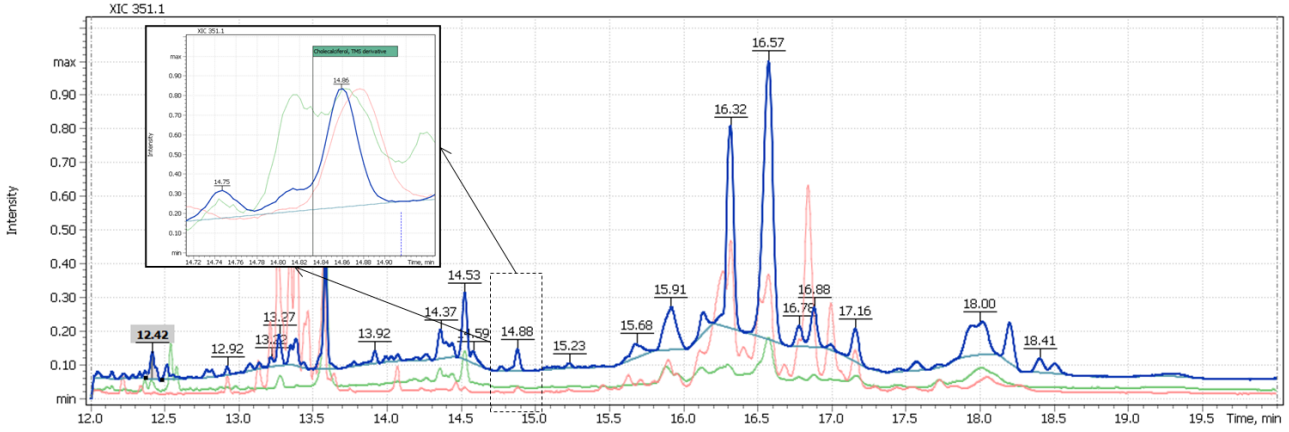
Результат анализа: 0.0737 ppm. Количественная оценка проведена по: площадь пика (m/z 351.1). ISTD: не использ. Квалификаторы: 366.2, 456.3
Ожидаемое врем выхода: 14.832 мин +/-5.00 с; Ионы фрагментов: 351.1 Да (100 %), 366.2 Да (16.3 %), 456.3 Да (19 %)

Ион, m/z, Da	Интеграл	Высота	SNR (peak-to-peak)	SNR (RMS)	Интенсивность, %	Номинальная интенс., %
351.1	2839817	228944	572.4	1144.7	100	100
366.2	424744	31626	79.1	158.1	15	16
456.3	520208	38989	106.2	354.3	18	19



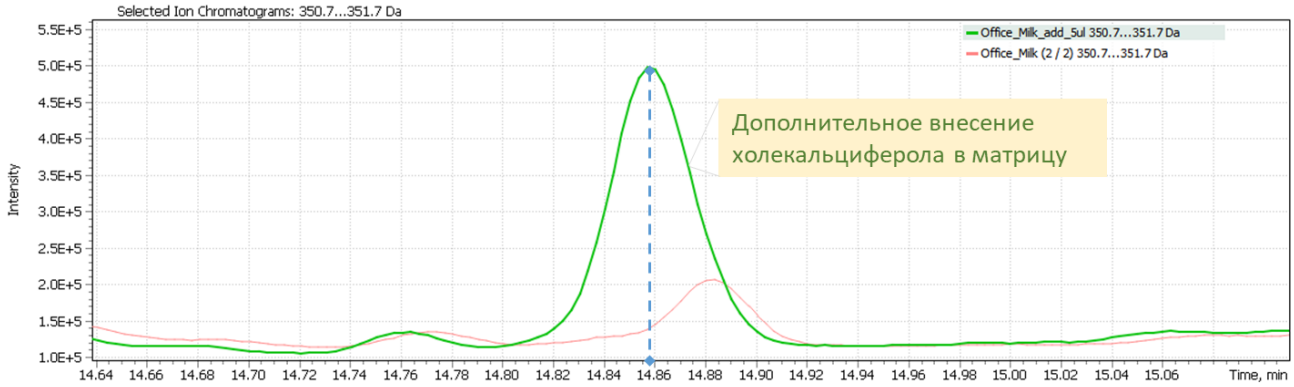
На рисунке 5 представлена масс-хроматограмма образца стандартного молока без дополнительного витаминизирования. Результаты анализа показали отсутствие витамина D_3.

Рис. 5. Масс-хроматограмма TIC (SIM) молока образца #2.



На рисунке 6 также представлено сопоставление сигналов целевого иона для молока образца #2 и масс-хроматограмма того же образца, но уже с дополнительным внесением холекальциферола в экстракт. Данный рисунок демонстрирует корректность детектирования сигнала и подтверждение отсутствие витамина D_3 в образце молока, не имеющего специальной маркировки о дополнительном внесение витамина D_3.

Рис. 6 Наложение масс-хроматограммы EIC (SIM) целевого иона холекальциферола (361.2 Da) в результате дополнительного внесения целевого компонента и экстракта образца #2.



Выводы

Результаты эксперимента демонстрируют возможность применения хромато-масс-спектрометрической системы для анализа витамина D_3 (холекальциферол) для контроля качества молочной продукции. Метод может быть рекомендован к использованию в лабораториях для рутинных анализов по контролю содержания витамина D_3 в молоке и молочной продукции обогащенной витаминами.

Хромато-масс-спектрометрическая система «Маэстро-αMC» (ООО «Интерлаб», Россия) позволяет детектировать холекальциферол в широком диапазоне концентраций. Таким образом надёжно контролировать не только физическое присутствие витамина D_3 в образцах, но и определять его количество и следовые концентрации на фоне высокоинтенсивных компонентов матрицы.

Литература

1. *Колунтаев. Д.А.* Определение суммарного витамина D (25-OH витамин D_3 и 25-OH витамин D_2) в плазме человека методом газовой хромато-масс-спектрометрии с помощью системы «Маэстро-αMC». App Note-13/2020GCMS
2. *Holden, J.M.* and *Lemar, L.E.*, Am J Clin Nutr 2008; 88(supl): 551S-3S
3. Food labeling: Revision of the nutritional and supplement facts labels, FDA, Federal Register / Vol. 81, No. 103/Friday, May 27, 2016 / Rules and Regulations
4. *Jinchuan Yang, Gareth Cleland,* and *Kari Organtini*. Determination of Vitamin D and previtamine D in Food Products. Application Note. Waters Corporation, 720006064EN
5. *Колунтаев. Д.А.* Определение остаточных количеств действующих веществ пестицидов в образце винного сорта винограда с использованием инновационного алгоритма расчёта количественного анализа данных «Flexible SIM» и квадрупольного масс-детектора «Maestro-αMS». App Note-7/2019GCMS