



Определение содержания холекальциферола
(витамина D₃) 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 D₃, молоко, дериватизация MSTFA, iDwell®Time, FlexibleSIM.

Резюме

Продemonстрирована возможность хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αМС для количественного определения жирорастворимого витамина D₃ (холекальциферола) в молоке.

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 относятся шесть стерина (витамины D₁, D₂, D₃, D₄, D₅ и D₆), при этом ключевую роль в организме человека играют два из них: витамин D₂ — эргокальциферол и **витамин D₃ — холекальциферол**. Эргокальциферол (D₂) образуется в клетках растений из эргостерола и может поступать в организм человека только с пищей или с пищевыми добавками. Холекальциферол (D₃) в основном синтезируется у человека в коже под действием ультрафиолетовых лучей диапазона «В» (UVB, 280—315 нм) и также может поступать с продуктами животного происхождения [1].

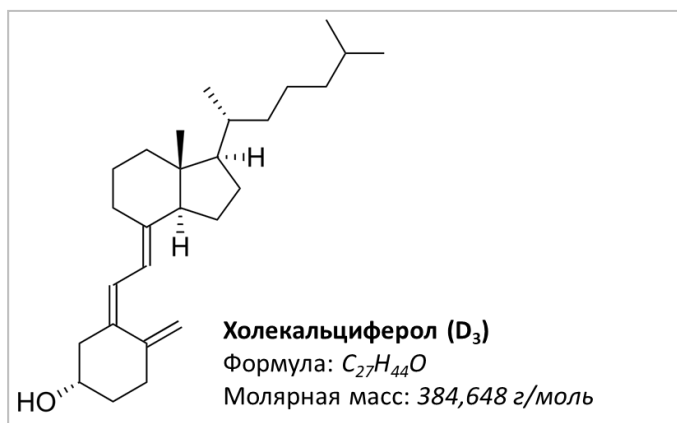


Рис. 1. Структурная формула витамина D₃ (холекальциферол)

Недавние исследования показали, что организм человека может не производить достаточного количества витамина D₃ 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 D₃ на продуктовых этикетках [3]. Изменения в правилах маркировки были направлены исключительно на повышение осведомленности потребителей о витамине D₃ [4].

Применяемый в настоящее время метод для анализа витамина D₃ 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 D₃ (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 D₃ в молоке с помощью моноквадрупольной хромато-масс-спектрометрической системы «Маэстро-αМС» (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 внесении витамина D₃.

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
Т° 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
Т° интерфейса МС	250°C
Параметры детектирования	
Источник ионизации	ЭИ (EI)
Т° 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 инжестировали в хроматограф в объёме 1,0 мкл. Используемые параметры инструментального метода представлены в таблице 1.

Табл. 2. Времена элюирования искоемых 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

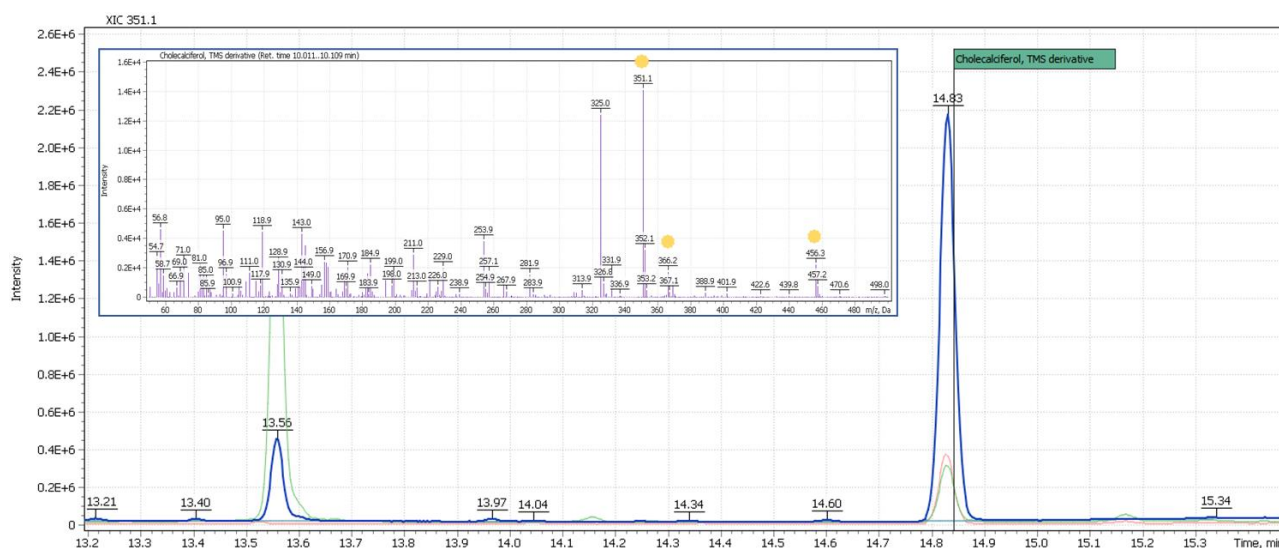


Рис. 2. Модельная хроматограмма дериватизированного стандарта холекальциферола (концентрация стандарта 0,55 ppm (SIM)) и его масс-спектр (SCAN, концентрация 22,0 ppm).

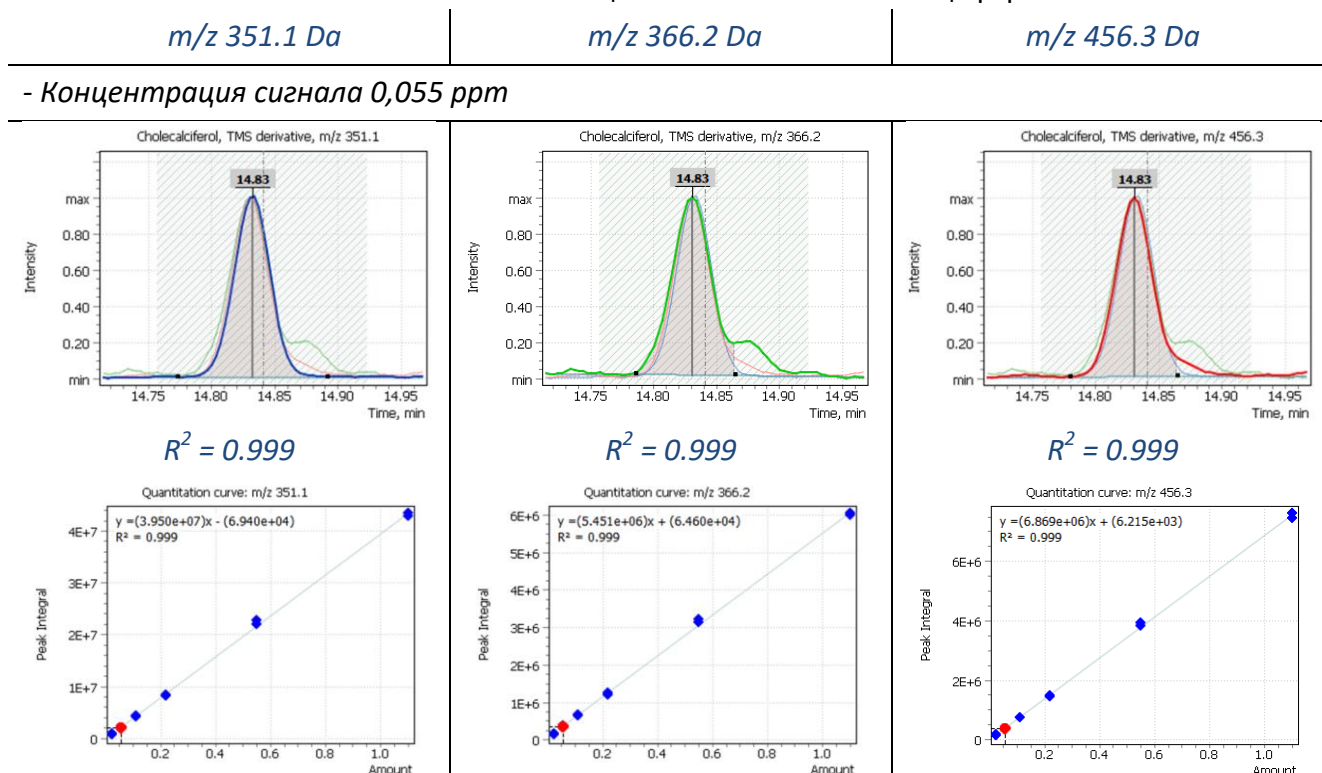
Результаты и обсуждение

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.

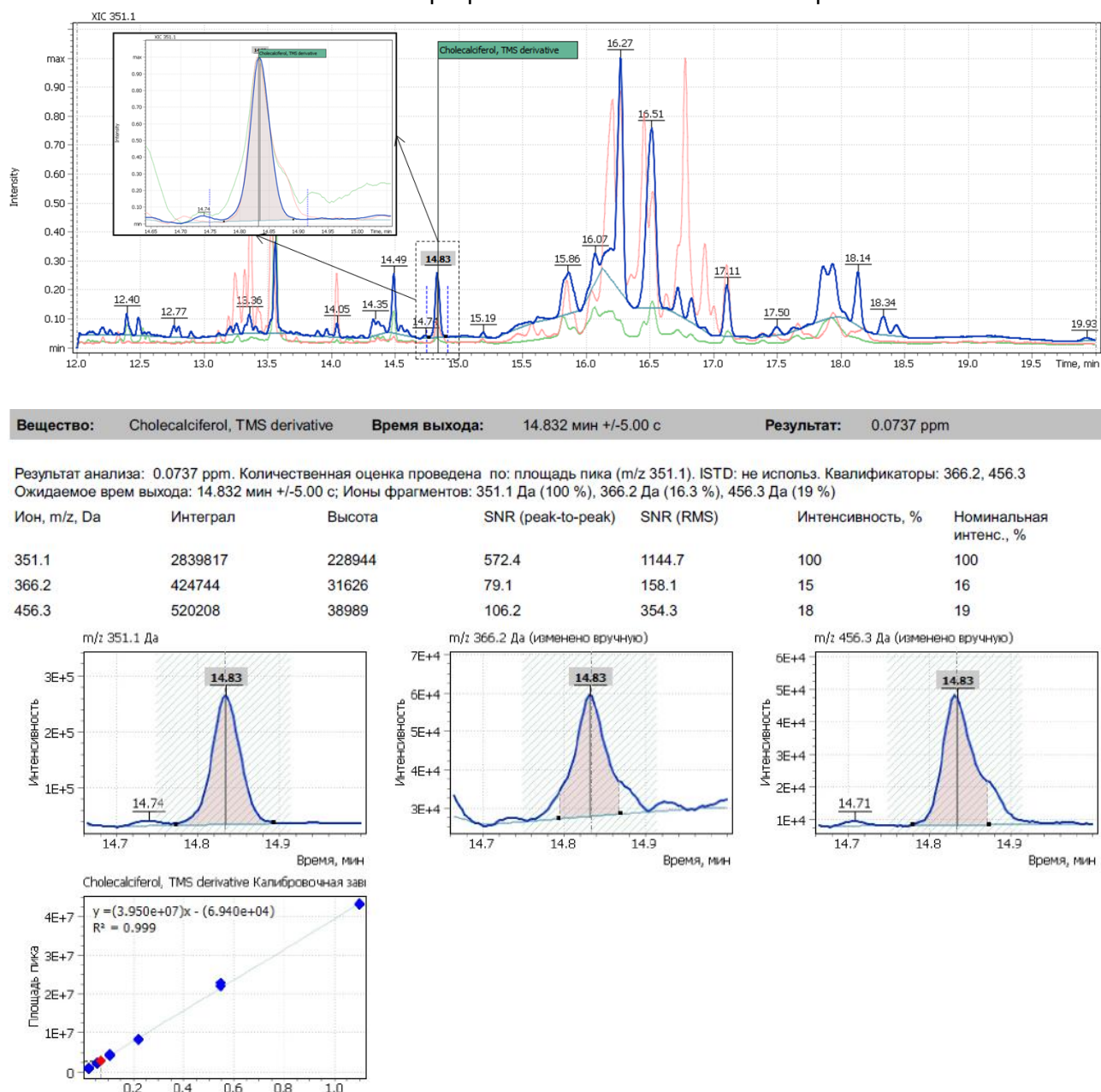


Практическая оценка применимости метода

Метод рутинного анализа витамина D₃ в молоке с помощью моноквадрупольной хромато-масс-спектрометрической системы «Маэстро-αМС» апробирован на образцах молока двух типов. В образце витаминизированного молока (**Прим.** согласно нормировке продукции содержание витамина D₃ составляет 2 мкг/100 мл продукта) было надёжно зафиксировано содержание витамина D₃. Его концентрация соответствовала указанной концентрации на упаковочной таре молока:

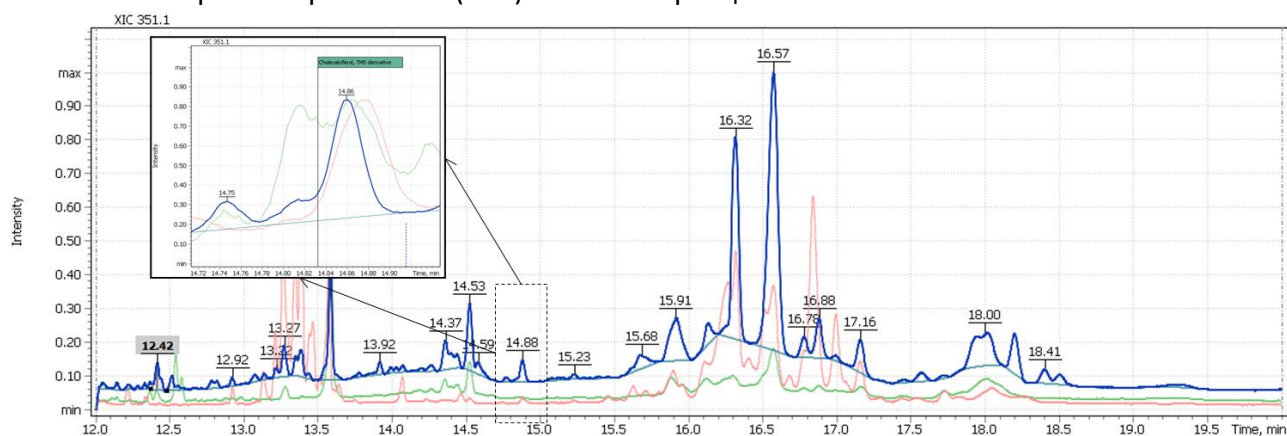
- 0,0737 ppm (нг/мкл), что соответствует (согласно объёму пробы принятой к эксперименту) 2 мкг/100 мл продукции.

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



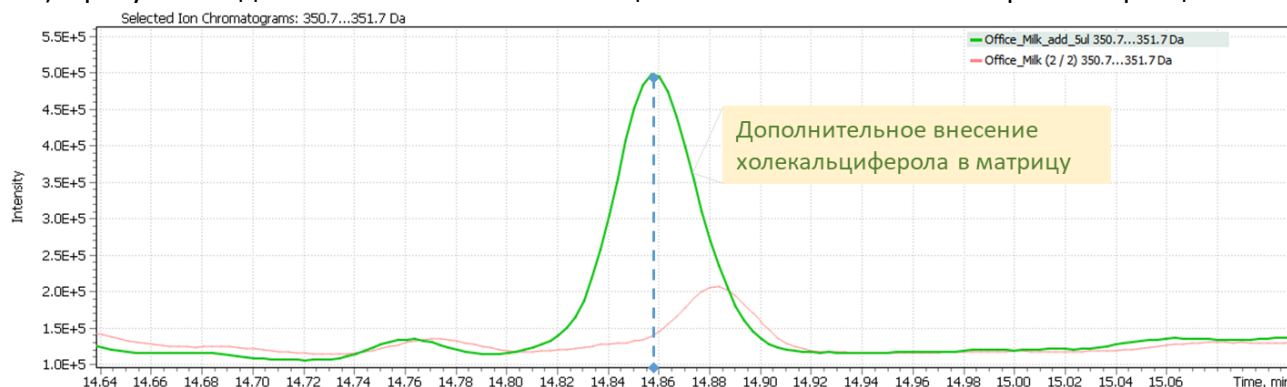
На рисунке 5 представлена масс-хроматограмма образца стандартного молока без дополнительного витаминизирования. Результаты анализа показали отсутствие витамина D₃.

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 отсутствия витамина D₃ в образце молока, не имеющего специальной маркировки о дополнительном внесении витамина D₃.

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 хромото-масс-спектрометрической системы для анализа витамина D₃ (холекальциферол) для контроля качества молочной продукции. Метод может быть рекомендован к использованию в лабораториях для рутинных анализов по контролю содержания витамина D₃ в молоке и молочной продукции обогащенной витаминами.

Хромото-масс-спектрометрическая система «Маэстро-αМС» (ООО «Интерлаб», Россия) позволяет детектировать холекальциферол в широком диапазоне концентраций. Таким образом надёжно контролировать не только физическое присутствие витамина D₃ 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 D₃ и 25-OH витамин D₂) в плазме человека методом газовой хромото-масс-спектрометрии с помощью системы «Маэстро-αМС». 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