

УДК 637.12.04/.07

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-359-5-132-136>

исследования/ research

Жижин Н.А.

ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35

E-mail: zhizhinmoloko@mail.ru

Ключевые слова: витамин В₁₂, детское питание, хроматография, масс-спектрометрия, сухие смеси

Для цитирования: Жижин Н.А. Определение витамина В₁₂ в сухих смесях для детского питания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с хромато-масс-спектрометрическим детектированием. Аграрная наука. 2022; 359 (5): 132–136.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-359-5-132-136>

Автор несет ответственность за работу и представленные данные.

Nikolay A. Zhizhin

All-Russian Research Institute of the Dairy Industry, 35, Lyusinovskaya st., Moscow, 115093, Russia
Email: zhizhinmoloko@mail.ru

Key words: vitamin B₁₂, baby food, chromatography, mass-spectrometry, dry mixes

For citation: Zhizhin N.A. Determination of vitamin B₁₂ in dry mixtures for baby food by the method of high performance liquid chromatography with chromatomass-spectrometric detection. Agrarian Science. 2022; 359 (5): 132–136. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-359-5-132-136>

The author bear responsibility for the work and presented data.

Определение витамина В₁₂ в сухих смесях для детского питания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с хромато-масс-спектрометрическим детектированием

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Витамин В₁₂ (кобаламин) относится к группе водорастворимых витаминов. Данный витамин относится к классу тетрапирролов, биологически активных веществ, состоящих из пиррольных колец, связанных с ионами металлов. Так, в молекуле витамина В₁₂ ядром является ион кобальта. Особенностью данного витамина является то, что его синтез в природе осуществляется только бактериями, в связи с чем он присутствует только в продуктах животного происхождения. И одним из источников его получения является молоко и молочные продукты, в том числе обогащенные витаминами группы В. Низкие концентрации витамина В₁₂, даже в обогащенных витаминными комплексами молочных продуктах, на уровне десятых и сотых долей миллиграмма, делают оценку его количественного содержания непростой аналитической задачей. Использование для этой цели обращено-фазовой жидкостной хроматографии с последующим детектированием посредством спектрофотометрического или диодно-матричного детектора связано с трудоемкой методикой пробоподготовки. В том числе и с многократным концентрированием пробы для достижения необходимых концентраций искомого вещества. В связи с чем разработка аналитического метода, позволяющего убрать описанные выше недостатки, является актуальной задачей.

Методы. В данной статье предлагается методика по оценке содержания витамина В₁₂ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-спектрометрического детектора (ВЭЖХ-МС). Разработанный в данном исследовании метод возможно использовать для лабораторного анализа витамина В₁₂ в сухих смесях, предназначенных для детского питания, что обеспечит возможность более быстрого и эффективного получения результатов для целей контроля и мониторинга детского питания, обогащенного витаминными комплексами водорастворимых витаминов группы В.

Результаты. Представлен способ пробоподготовки, при котором коэффициент восстановления аналита в исследуемых образцах составил 99,12–99,31%. При оценке калибровочной кривой коэффициент корреляции составил $r_2 = 99,999$. Рассчитанный предел обнаружения — 0,02 мкг/кг.

Determination of vitamin B₁₂ in dry mixtures for baby food by the method of high performance liquid chromatography with chromatomass-spectrometric detection

ABSTRACT

Relevance. Vitamin B₁₂ (cobalamin) belongs to the group of water-soluble vitamins. This vitamin belongs to the class of tetrapyrroles, biologically active substances consisting of pyrrole rings associated with metal ions. So, in the vitamin B₁₂ molecule, the core is the cobalt ion. A feature of this vitamin is that its synthesis in nature is carried out only by bacteria, and therefore, it is present only in products of animal origin. And one of the sources of its receipt is milk and dairy products, including those enriched with B vitamins. Low concentrations of vitamin B₁₂, even in vitamin-enriched dairy products, at the level of tenths and hundredths of a milligram, make the assessment of its quantitative content a difficult analytical task. The use of reversed-phase liquid chromatography for this purpose, followed by detection by means of a spectrophotometric or diode-array detector, is associated with a time-consuming sample preparation technique. Including repeated concentration of the sample to achieve the required concentrations of the desired substance. In this connection, the development of an analytical method that allows to remove the disadvantages described above, is an urgent task.

Methods. This article proposes a method for assessing the content of vitamin B₁₂ by high performance liquid chromatography using a mass-spectrometric detector (HPLC-MS). The method developed in this study can be used for laboratory analysis of vitamin B₁₂ in dry formulas for baby food, which will provide the possibility of faster and more efficient results for the control and monitoring of baby food enriched with vitamin complexes of water-soluble vitamins of group B.

Results. A method of sample preparation is presented, in which the recovery coefficient of the analyte in the studied samples was 99.12–99.31%. When evaluating the calibration curve, the correlation coefficient was $r_2 = 99.999$. The calculated limit of detection is 0.02 g/kg.

Поступила: 11 апреля 2022
Принята к публикации: 5 мая 2022

Received: 11 Aprile 2022
Accepted: 5 May 2022

Введение

Биологическая функция витамина B_{12} хорошо изучена. Различными исследователями показано, что его недостаток в рационе питания детей может приводить к таким явлениям, как анемия и различные неврологические заболевания [1, 2].

В связи с особенностями синтеза витамина B_{12} , основными его источниками являются продукты животного происхождения, в том числе молоко и молочные продукты [3]. Несмотря на то, что данный витамин можно получать из продуктов питания, как правило, его количества, потребляемого с пищей, недостаточно для развития и поддержания функций организма. В связи с этим для предотвращения дефицита витамина B_{12} рекомендуется принимать в пищу обогащенные продукты для достижения суточной нормы потребления, что особенно важно для развивающегося организма детей [4].

Принимая во внимание большой ассортимент коммерчески доступных молочных продуктов или продуктов на основе молока, предназначенных для детского питания, с внесением витаминных комплексов, и в частности витамина B_{12} , требуется наличие надежных методов контроля для обеспечения безопасности применения данного вида продукции [5, 6].

В настоящее время для контроля содержания витамина B_{12} используются следующие методы — хемилюминесценция [7], микробиологический [8], спектрофотометрия [9], атомно-абсорбционная спектрометрия, капиллярный электрофорез (КЭФ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [10]. Наибольшее развитие получило применение методов КЭФ и ВЭЖХ в связи с их высокой чувствительностью и селективностью. Однако, несмотря на эти качества, в большинстве случаев, их применение затруднительно в связи с низкой концентрацией определяемого вещества в продуктах питания и наличием мешающих компонентов матрицы, что приводит к необходимости использования трудоемкой, многостадийной процедуры пробоподготовки. Что, в свою очередь, влияет на качество и стоимость проведения анализа [11].

Описанные недостатки количественного измерения витамина B_{12} стало возможно устранить посредством развития высокоточных аналитических приборов, к которым относится метод хромато-масс-спектрометрии.

Применение масс-спектрометра в качестве детектора в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией позволяет проводить измерения с применением обращенно-фазового механизма разделения на обычной хроматографической колонке C18 и проводить измерения витаминов группы В на уровне концентрации нг/г [12].

Целью проведенной работы была разработка способа определения витамина B_{12} в обогащенных витаминами сухих смесях, предназначенных для детского питания, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-спектрометрического детектора (ВЭЖХ-МС). На основе полученных данных были разработаны условия хроматографирования, а также предложен вариант пробоподготовки образцов для количественного определения.

Методика исследования

В качестве матрицы для разработки методики были применены коммерческие смеси для детского питания, обогащенные витаминно-минеральным комплексом. Был использован аналитический стандарт витамина B_{12} фирмы «SIGMA-ALDRICH».

Экспериментальную часть проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1260», состоящем из автосамплера, высокоскоростного насоса и многоколочно-го термостата. В качестве детектора использовалась тройная квадрупольная система ЖХ/МС «Agilent 6465».

Система управлялась программным обеспечением «Agilent MassHunter Acquisition» версии 10.1. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения для количественного анализа «MassHunter» версии 10.1 и программного обеспечения для качественного анализа «MassHunter» версии 10.0.

Для экстракции витамина B_{12} применяли ацетонитрил степени очистки для ВЭЖХ и аскорбиновую кислоту в качестве антиокислителя.

Результаты и их обсуждение

Поскольку витамин B_{12} относится к группе водорастворимых витаминов и обладает высоким сродством к воде, то оптимально использовать именно ее в качестве растворителя. Однако высокое содержание белковой и жировой фазы в матрице исследуемого продукта являются мешающим компонентом, который необходимо убрать. Для этой цели в качестве осадителя белков и растворителя для жировой фазы использовали ацетонитрил. Для предотвращения окисления аналита применялась добавка аскорбиновой кислоты. Схема пробоподготовки представлена на рисунке 1.

Далее была проведена процедура оптимизация хроматографического метода, на основании которой были получены параметры хроматографического разделения, представленные в таблицах 1 и 2.

Полученные условия детектирования ЖХ/МС витамина B_{12} представлены в таблице 3.

На основе полученных хроматографических параметров был проведен анализ сухих смесей для детского питания, обогащенных витамином B_{12} . Пример хроматограммы приведен на рисунке 2.

Полученный хроматографический пик витамина B_{12} был подтвержден наличием характеристичных ионов (рис. 3).

Рис. 1. Схема пробоподготовки сухих смесей для определения витамина B_{12}

Fig. 1. Scheme of sample preparation of dry mixtures for the determination of vitamin B_{12} .

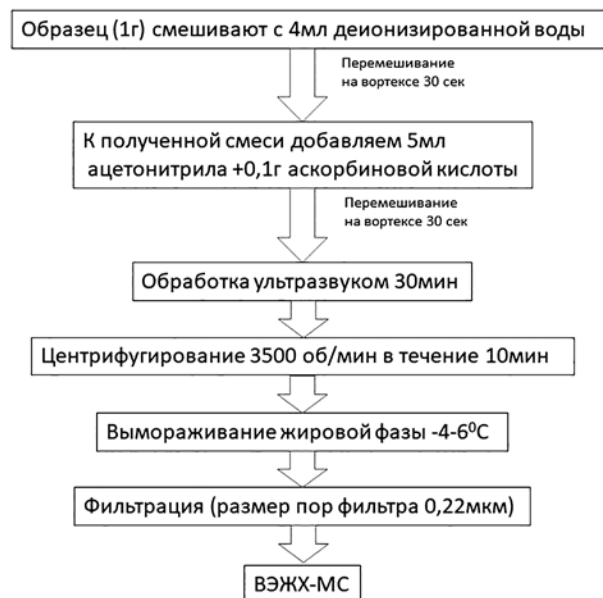


Таблица 1. Параметры хроматографического разделения

Table 1. Chromatographic separation parameters

Параметр	Установки			
Хроматографическая колонка	Agilent InfinityLab 120 Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm			
Температура термостата колонок	40±2 °C			
Мобильная фаза А	20 ммоль формиата аммония + 0,1% раствора муравьиной кислоты в воде			
Мобильная фаза Б	0,1% раствор муравьиной кислоты в метаноле			
Раствор для промывки иглы автосамплера	50/50 метанол/вода			
Градиент подачи элюента	Время (мин.)	Скорость потока (мл/мин.)	А%	Б%
	0	0,5	97	3
	1	0,5	94	6
	4,5	0,5	55	45
	5,5	0,5	10	90
	6,5	0,5	40	60
	7,0	0,5	40	60
	8,0	0,5	40	60
	8,6	0,5	97	3
9	0,5	97	3	

Таблица 2. Параметры масс-спектрометрического анализа

Table 2. Mass-spectrometric analysis parameters

Параметры	Установки
Сканирование	Мониторинг множественных реакций (MRM)
Тип источника ионов	Ионизация электрораспылением
Температура осушающего газа	270 °C
Скорость потока осушающего газа	13 л/мин.
Давление распылителя	2,76 бар
Напряжение на капилляре	2500 В
Напряжение сопла	0В

Рис. 2. Хроматограмма анализа витамина В₁₂ в сухой смеси для детского питания

Fig. 2. Chromatogram analysis of vitamin B₁₂ in dry formula for baby food

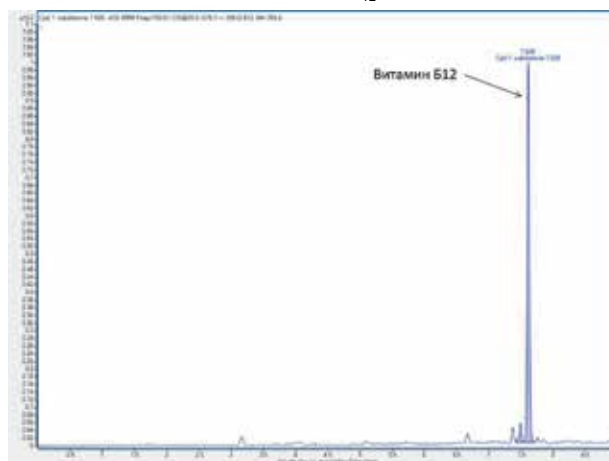
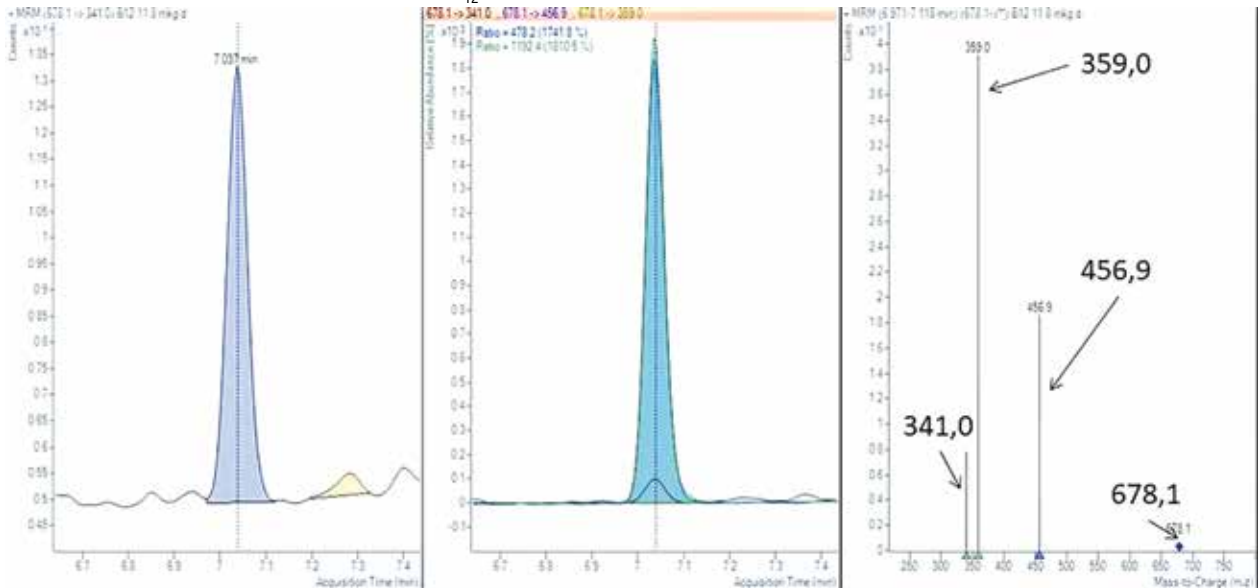


Таблица 3. Специфические условия ЖХ/МС для витамина В₁₂

Table 3. Specific LC/MS conditions for vitamin B₁₂

Компонент	Ион-предшественник (m/z)	Ион-продукт (m/z)	Время выхода компонента (мин.)	Фрагментор (V)	Энергия столкновения (V)
Витамин В ₁₂	678,1	456,9	7,6	152	25
	678,1	359,0	7,6	152	25
	678,1	341,0	7,6	152	14

Рис. 3. Масс-спектр характеристичных ионов витамина В₁₂**Fig. 3.** Mass-spectrum of characteristic ions of vitamin B₁₂

При проведении валидации методики были оценены такие параметры, как линейность калибровочной кривой, коэффициент корреляции составил $r_2 = 99,999$. Относительное смещение времени удерживания анализов по сравнению с пиками стандартного вещества составило 5%. Был проанализирован также параметр степени экстракции аналита из матрицы, который варьировался в пределах от 99,12 до 99,31%, что можно считать приемлемым результатом для количественного расчета витамина В₁₂. Рассчитанный предел обнаружения составил 0,02 мкг/кг.

Выводы

В процессе проведения исследования был разработан селективный и чувствительный метод на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-спектрометрического детектора.

Предел обнаружения в 0,02 мкг/кг был достигнут без применения трудоемких процедур очистки, концентрирования и других способов повышения чувствительности хроматографического метода. Что, в свою очередь, приводит к снижению себестоимости анализа и времени на его проведение.

Данный метод можно применять для проведения контрольных мероприятий по мониторингу содержания витамина В₁₂ в сухих смесях для детского питания, обогащенных витаминными комплексами.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Авдей. Г.М. Неврологические проявления при дефиците витамина В₁₂ / Авдей Г.М., Кулеш С.Д., Хоперский П.Г., Оганесян А.А // Медицинские новости.2020.- №4(307).- С. 47-51
2. Лунякова М.А. Витамин В₁₂ - дефицитная анемия у детей грудного возраста: клиническая картина, современные методы диагностики и лечения / Лунякова М.А., Демихов В.Г., Дронова С.Н., Калинина Ю.Ю., Журин О.Н // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2019.- Т.18.- №3.- С. 70-77 DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-70-77
3. H. Chassaing, Ryszard Lobinski. Direct species-selective determination of cobalamins by ionspray mass spectrometry and ionspray tandem mass spectrometry. *Analyst*, Royal Society of Chemistry, 1998, 123 (1), pp.131--137. DOI: 10.1039/a704698g
4. Вдовиченко В.П. Факторы риска развития дефицита витамина В₁₂ и его последствия / Вдовиченко В.П., Бронская Г.М., Борисено О.А., Коршак Т.А // Медицинские новости. 2019.- №8(299).- С. 13-18
5. Юрова Е.А. Контроль качества и безопасности продуктов функциональной направленности на молочной основе // Молочная промышленность.2020.-№6.- С. 12-15
6. Юрова Е.А. Разработка современных методов анализа для идентификации молока и молочной продукции // Молочная река.2020.- №2(74).- С.20-25
7. Campos-Giménez, E, Fontannaz P, Trisconi MJ, Kiliń

T, Gimenez C, Andrieux P, 2008. Determination of vitamin B₁₂ in food products by liquid chromatography/UV detection with immunoaffinity extraction: single-laboratory validation. *J AOAC Int* 91:786-93

8. H. Lichtenstein, A. Beloian, H. Reynolds J. Vitamin B₁₂ in Foodstuffs, Comparative Vitamin B₁₂ Assay of Foods of Animal Origin by *Lactobacillus leichmannii* and *Ochromonas malhamensis* *Agric. Food Chem.*, 7 (1959), p. 771

9. B. Morelli, Fresen. J. *Anal. Chem.* 354 (1996) 97. Determination of a Quaternary Mixture of Vitamins B₆, B₁, and B₁₂ and Uridine 5'-Triphosphate by Derivative Spectrophotometry DOI:10.1002/jps.2600840109

10. Kumar, S. S., Chouhan, R. S., & Thakur, M. S. (2010). Trends in analysis of vitamin B₁₂. *Analytical Biochemistry*, 398(2), 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.06.041>.

11. Hua-Bin Li, Feng Chen, Yue Jiang, 2000. Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection *Journal of Chromatography A* 891(2):243-247 DOI:10.1016/S0021-9673(00)00724-X

12. Zironi E, Gazzotti T, Barbarossa A, Devicienti C, Scardilli M, Pagliuca G, 2013. Technical note: development and validation of a method using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of vitamin B-12 concentrations in milk and dairy products. *J Dairy Res* 96:2832-6.

REFERENCES

1. Avdey. G.M. Neurological manifestations in vitamin B12 deficiency / Avdey G.M., Kulesh S.D., Khopersky P.G., Oganessian A.A.
2. Lunyakova M.A. Vitamin B12 - deficiency anemia in infants: clinical picture, modern methods of diagnosis and treatment / Lunyakova M.A., Demikhov V.G., Dronova S.N., Kalinina Yu.Yu., Zhurina O.N. // Questions hematology/oncology and immunopathology in pediatrics. 2019.- T.18.- №3.- S. 70-77DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-70-77
3. H. Chassaingne, Ryszard Lobinski. Direct species-selective determination of cobalamins by ionspray mass spectrometry and ionspray tandem mass spectrometry. Analyst, Royal Society of Chemistry, 1998, 123 (1), pp.131--137. DOI: 10.1039/a704698g
4. Vdovichenko V.P. Risk factors for the development of vitamin B12 deficiency and its consequences / Vdovichenko V.P., Bronskaya G.M., Borisenko O.A., Korshak T.A. // Medical News. 2019.- №8(299).- S. 13-18
5. Yurova E.A. Quality control and safety of milk-based functional products // Dairy industry.2020.-№6.- P. 12-15
6. Yurova E.A. Development of modern methods of analysis for the identification of milk and dairy products // Molochnaya reka.2020.- №2(74).- P.20-25
7. Campos-Giménez, E, Fontannaz P, Trisconi MJ, Kiling

T, Gimenez C, Andrieux P, 2008. Determination of vitamin B12 in food products by liquid chromatography/UV detection with immunoaffinity extraction: single-laboratory validation. J AOAC Int 91:786-93

8. H. Lichtenstein, A. Beloian, H. Reynolds J. Vitamin B12 in Foodstuffs, Comparative Vitamin B12 Assay of Foods of Animal Origin by Lactobacillus leichmannii and Ochromonas malhamensis Agric. Food Chem., 7 (1959), p. 771

9. B. Morelli, Fresen. J. Anal. Chem. 354 (1996) 97. Determination of a Quaternary Mixture of Vitamins B6, B1, and B12 and Uridine 5'-Triphosphate by Derivative Spectrophotometry DOI:10.1002/jps.2600840109

10. Kumar, S. S., Chouhan, R. S., & Thakur, M. S. (2010). Trends in analysis of vitamin B12. Analytical Biochemistry, 398(2), 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.06.041>.

11. Hua-Bin Li, Feng Chen, Yue Jiang, 2000. Determination of vitamin B12 in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection Journal of Chromatography A 891(2):243-247 DOI:10.1016/S0021-9673(00)00724-X

12. Zironi E, Gazzotti T, Barbarossa A, Devicienti C, Scardilli M, Pagliuca G, 2013. Technical note: development and validation of a method using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of vitamin B-12 concentrations in milk and dairy products. J Dairy Res 96:2832-6.

ОБ АВТОРЕ:

Жижин Николай Анатольевич, кандидат технических наук, научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности»

ABOUT THE AUTHOR:

Nikolay A. Zhizhin, Candidate of Technical Sciences, Researcher, All-Russian Research Institute of the Dairy Industry

НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ •

На Дону построят завод по производству кормов для КРС

В Ростовской области запланировано строительство завода по производству кормов для КРС. Импортозамещающий инвестпроект в Орловском районе реализует Кагальницкий мясокомбинатный завод, сообщила на заседании совета по инвестициям при губернаторе и.о. министра сельского хозяйства и продовольствия области Ольга Горбанева.

Сроки реализации проекта – с 2022-го по 2025 год. «Основное сырье – утилизированные надлежащим образом отходы животного происхождения», – пояснила чиновник. По ее данным, на сегодняшний день уже закуплено оборудование на 30 млн рублей.

В результате реализации проекта в регионе появится 100 новых рабочих мест.

(Источник: milknews.ru)

В 2022 году объем реализации молока в сельхозорганизациях вырос на 3,3%

По данным Минсельхоза России, по состоянию на 9 мая текущего года суточный объем реализации молока сельскохозяйственными организациями составил 53,11 тыс. т, что на 3,3% (1,68 тыс. т) больше показателя за аналогичный период прошлого года.

Максимальные объемы реализации от 1,5 тыс. т достигнуты в Республике Татарстан, Удмуртской Республике, Краснодарском крае, Воронежской, Кировской, Новосибирской, Свердловской, Белгородской, Ленинградской, Московской областях.

Средний надой молока от одной коровы за сутки составил 19,86 кг, что на 1,12 кг больше, чем годом ранее. Лидерами среди регионов по данному показателю являются Курская, Калининградская, Ленинградская области. В этих регионах получено более 25 кг молока в расчете на 1 корову.

Первый Соевый Демо-Полигон засеян в Самарской области

В Приволжском районе Самарской области засеян первый Соевый Демо-Полигон: на 60 га размещено 30 сортов сои от разных производителей и 4 системы защиты.

Как заверили агрономы, посев сои на две недели позже привычных сроков, – связанный с обрушившимися на Поволжье затяжными дождями и холодами, – не принесет каких-либо отклонений. Главное, чтобы за весь сезон была набрана необходимая сумма эффективных температур, отметили специалисты.

За посевами в ежедневном режиме будут наблюдать ученые Самарского государственного университета, а также агрономы предприятия «Сев-07» – крупнейшего производителя сои в области.

(Источник и фото: официальный портал Соевого Союза ПФО)