На правах рукописи

ШЕЛЕМЕТЬЕВА ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ПРЕМИКСАХ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Томск – 2009

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии Томского политехнического университета

Научный руководитель — **Доктор химических наук, старший научный сотрудник Слепченко Галина Борисовна**

Официальные оппоненты: — **Доктор технических наук, профессор Зибарев Павел Викторович**

Кандидат химических наук Мордвинова Нина Михайловна

Ведущая организация: — **ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»**

Защита состоится «18» ноября 2009 г. в 16 час. 30 мин. на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.269.04 при Томском политехническом университете по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Томского политехнического университета по адресу: 634050, г. Томск, ул. Белинского 53.

Автореферат разослан «____» октября 2009 г.

Ученый секретарь совета по защите докторских и кандидатских диссертаций кандидат химических наук — **Гиндуллина Т.М.**

Актуальность

Водорастворимые и жирорастворимые витамины – незаменимые органические вещества, биологические катализаторы химических реакций, протекающих в организме человека; они активно участвуют в обмене веществ и поступают в организм человека практически полностью из внешней среды.

Для поддержания баланса витаминов в организме широкое применение нашли витаминизированные продукты и биологически активные добавки к пище (БАД). Одним из важнейших показателей потребительского качества продукции подобного рода является соответствие содержания биологически активных веществ согласно заявленной рецептуре. Для восстановления качества продуктов питания был принят документ «Основы государственной политики в области здорового питания граждан Российской Федерации на период до 2020 года», пришедший на смену «Концепции здорового питания населения России до 2005 года».

Разработка и совершенствование методов определения витаминов является актуальной задачей, от решения которой зависит качество и безопасность подобной продукции. Выбор инструментального метода анализа для определения водо- и жирорастворимых витаминов в пищевых продуктах обусловлен рядом общих соображений, например: пределами обнаружения метода в зависимости от определяемых содержаний, требованием многоэлементности, допускаемой погрешностью, временными затратами, стоимостью анализа. Безусловно, предпочтение отдается методам, требующим минимальной подготовки пробы к анализу при максимальной информативности. Таким требованиям максимально удовлетворяет метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Современное развитие метода ВЭЖХ расширило аналитические возможности определения витаминов в обогащенных пищевых продуктах. Необходимая подготовка пробы образца весьма проста относительно других методов, что связано прежде всего с исключительной универсальностью, высокой эффективностью разделения, благоприятными условиями анализа (низкая температура, инертный растворитель, отсутствие контакта с кислородом).

Однако, несмотря на интенсивное развитие этого метода в последние 10 лет, в литературных источниках практически отсутствуют методики определения витаминов в таких объектах, как БАД. Трудности в создании методик во многом обусловлены сложностью объектов анализа, таких как обогащенные продукты, в состав которых входят лекарственное растительное сырье (ЛРС), растительные экстракты (РЭ), различные минеральные добавки, красители и другие наполнители; низкими концентрациями витаминов в объектах анализа и высокой чувствительностью к термическому, фотоокислительному и химическому воздействиям. Поэтому разработка экспрессных методик одновременного количественного определения водо- и жирорастворимых витаминов в БАД является актуальной задачей.

Цель диссертационной работы

Исследование параметров хроматографического определения водорастворимых витаминов группы В, выбор оптимальных условий их определения и разработка экспрессных методик аналитического контроля БАД, пищевых продуктов и премиксов на содержание жиро- и водорастворимых витаминов методом ВЭЖХ.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие ***задачи***:

- исследовать хроматографическое поведение водорастворимых витаминов при элюировании бинарными водосодержащими подвижными фазами на основе ацетонитрила, тетрагидрофурана и метанола, провести оценку коэффициентов емкости, асимметрии и разрешения пиков витаминов;

- установить параметры хроматографического определения водорастворимых витаминов группы В;
- оптимизировать основные стадии и предложить алгоритм пробоподготовки для определения витаминов в БАД, обогащенных пищевых продуктах и премиксах;
- разработать и метрологически аттестовать методики количественного химического анализа БАД, пищевых продуктов и премиксов на содержание витаминов.

Научная новизна

- впервые исследовано хроматографическое поведение водорастворимых витаминов при элюировании бинарными водосодержащими подвижными фазами на основе ацетонитрила, тетрагидрофурана и метанола и установлены условия определения водорастворимых витаминов методом ВЭЖХ;
- показана применимость универсальной квазихимической модели удерживания для оценки роли межмолекулярных взаимодействий сорбат-сорбент, модификатор-сорбент в хроматографической системе и проведен расчет параметров хроматографического разделения: коэффициентов емкости, асимметрии и разрешения пиков водорастворимых витаминов;
- проведена оценка мешающего влияния водорастворимых витаминов группы В при их совместном присутствии, рассчитаны предельные соотношения водорастворимых витаминов в пробе при заданной систематической погрешности и оценены основные составляющие органической матрицы при определении витаминов методом ВЭЖХ;
- впервые установлены и оптимизированы условия ультразвуковой обработки проб для интенсификации стадии экстракционного извлечения водорастворимых витаминов и разработан алгоритм подготовки проб БАД, пищевых продуктов и премиксов для последующего определения содержания водорастворимых витаминов методом ВЭЖХ;
- впервые разработаны методики количественного химического анализа проб БАД, пищевых продуктов и премиксов на содержание водо- и жирорастворимых витаминов методом ВЭЖХ.

Практическая значимость работы

- на основании проведенных исследований проведена метрологическая аттестация методик количественного химического анализа водорастворимых витаминов (ВРВ) и жирорастворимых витаминов (ЖРВ) для широкого круга объектов: премиксов, БАД и витаминизированных продуктов пищевой промышленности. Методики позволяют экспрессно (в течение 45-60 минут) проводить определение 6 водорастворимых витаминов в сложной матрице БАД;
- разработанные методики: «Биологически активные добавки, пищевые продукты, премиксы. Хроматографический (ВЭЖХ) метод определения массовой концентрации водорастворимых витаминов B_1, B_2, B_3 (никотинамид, никотиновая кислота), B_5, B_6 и фолиевой кислоты» и «Биологически активные добавки, премиксы. Хроматографический (ВЭЖХ) метод определения массовой концентрации жирорастворимых витаминов А, Е и $Д_3$» метрологически аттестованы и внесены в государственный Федеральный реестр методик выполнения измерений, допущенных к применению в сфере государственного метрологического контроля и надзора под номерами ФР.1.31.2005.01917, МУ 08-47/185 и ФР.1.31.2005.01810 МУ 08-47/184 и используются в практике аналитических лабораторий ЗАО «Эвалар» (г. Бийск), ЗАО «Алтайвитамины» (г. Бийск), ООО «Внешторгфарма» (г. Москва) и НИИ фармакологии (г. Томск), что подтверждается соответствующими актами о внедрении.

Положения, выносимые на защиту

1. Описание удерживания водорастворимых витаминов с позиций теории универсальной квазихимической модели удерживания в ВЭЖХ.
2. Закономерности удерживания водорастворимых витаминов группы В в условиях градиентной обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ и выбор рабочих условий хроматографического определения водорастворимых витаминов.
3. Условия пробоподготовки БАД, пищевых продуктов, премиксов и алгоритм оптимизации стадии УЗ-экстрагирования при определении витаминов.
4. Методики хроматографического определения водо- и жирорастворимых витаминов.

Апробация работы

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на международном симпозиуме «Федеральный и региональный аспекты политики здорового питания» (Кемерово, 2002), международной конференции «Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий» (Томск, 2006), региональной научно-практической конференции «Электрохимические методы анализа в контроле и производстве» (Томск, 2007), II Всероссийской конференции по аналитической химии» с международным участием (к юбилею академика Ю.А.Золотова) (Краснодар, 2007), международной выставке и научно-практической конференции «Аналитические методы измерений и приборы в пищевой промышленности» (Москва, 2007), VII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием «ЭМА-2008» (Уфа-Абзаково, 2008), II Международном Форуме «Аналитика и аналитики» (Воронеж , 2008), VIII научной конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Томск, 2008), IV Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2009).

Публикации Основные результаты работы изложены в 13 публикациях, в том числе 3 статьи в научных журналах, тезисы 10 докладов в трудах симпозиумов и конференций.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 138 страницах машинописного текста; состоит из введения, 5 глав, включая литературный обзор, выводов, списка цитируемой литературы (180 назв.) и 8 стр. приложения; содержит 25 рисунков, 27 таблиц.

Основное содержание работы

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, дана структура работы.

Глава 1. Представлен обзор литературы по физико-химическим методам исследования и определения витаминов в различных объектах, в котором рассмотрены основные свойства жирорастворимых (ЖРВ) и водорастворимых витаминов (ВРВ), аналитические возможности физико-химических методов и особенности высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при анализе ЖРВ и ВРВ, сформулированы задачи исследования.

В главе 2 приведены сведения об используемом оборудовании и реактивах, дана характеристика объектов анализа. Работа была выполнена на жидкостном хроматографе фирмы «Waters» с детектором с диодной матрицей. Использованы стальные колонки размером 3,9×150 мм, заполненные ОФ сорбентом Symmetry C_{18} с размером частиц 5 мкм. На стадии пробоподготовки анализируемых образцов использовано фильтровальное оборудование и микрофильтры с размером пор 0,45 мм (Millipor) и ультразвуковая баня «САПФИР» с рабочей частотой излучателей 35 кГц и температурным режимом от 20 до 75 ^{0}. В качестве растворителей применены ацетонитрил, тетрагидрофуран и метанол. В качестве стандартных образцов использованы водорастворимые витамины B_1, B_2, B_3

(никотинамид, никотиновая кислота), B_5, B_6, PP и фолиевая кислота, A, E, D_3 (Sigma) с содержанием основных компонентов не менее 98, 0 % по массе. В качестве объектов исследования использованы многокомпонентные сухие витаминизированные смеси (премиксы), биологически активные добавки (БАД), обогащенные пищевые продукты быстрого приготовления: кисели, каши, супы.

В главе 3 экспериментально подобраны рабочие условия определения водорастворимых витаминов методом ВЭЖХ и оценено мешающее влияние органической матрицы при определении водорастворимых витаминов.

Было исследовано влияние состава подвижной фазы (ПФ) на хроматографическое разделение ВРВ. В качестве объектов исследования использованы водорастворимые витамины фармакопейной чистоты: тиамина мононитрат (B_1), рибофлавин (B_2), никотинамид (B_3), кальция D -пантотенат (B_5), пиридоксина гидрохлорид (B_6) и фолиевая кислота (B_9). Удерживание водорастворимых витаминов было изучено на различных сорбентах: Atlantis-C_{18}, Simmetry-C_{18}, Wakosil II C_{18}. Наилучшее разделение было достигнуто на сорбенте СФ Simmetry-C_{18}, поэтому в качестве неподвижной фазы выбран сорбент Simmetry-C_{18}, для которого зависимость удерживания сорбата от состава бинарной подвижной фазы описывается уравнением Снайдера:

$$\lg k' = a - n \lg N_B \qquad (1)$$

где k'- коэффициент емкости (удерживания) сорбата; N_B – мольная доля компонента В в подвижной фазе;

n – отношение площадей пиков сорбата и наиболее сильно адсорбирующегося компонента В в подвижной фазе;

a –эмпирический коэффициент.

В состав хроматографической системы входили: сорбат *(S)* и двухкомпонентная подвижная фаза, включающая основной компонент – растворитель *(L)* и модифицирующую добавку *(M)*. В нашем случае *L* - вода, *M* - органический растворитель (метанол, ацетонитрил, тетрагидрофуран). Таким образом, мы имели дело с адсорбцией из трехкомпонентного раствора *(S, M, L)*, причем концентрация сорбата *S* на 3-4 порядка меньше концентрации модификатора *M* и растворителя *L*.

Количественное описание зависимости удерживания водорастворимых витаминов от мольной доли модификатора в бинарной подвижной фазе для обращенно-фазовой ВЭЖХ дается с применением универсальной квазихимической модели, учитывающей межмолекулярные взаимодействия компонентов хроматографической системы.

В хроматографической системе могут наблюдаться следующие виды взаимодействий: сорбат-сорбент, модификатор-сорбент, сорбат-модификатор модификатор-модификатор.

Если в системе преобладают взаимодействия сорбат-сорбент, модификатор-сорбент, то зависимость коэффициента удерживания от мольной доли модификатора M_m описывается соотношением (2):

$$\frac{1}{k^1} = \frac{\left[1 + \left(K_M - 1\right) \cdot M_m\right]}{\Phi \cdot K_S} = a_0 + a_1^{'} M_m \qquad (2)$$

Когда в системе преобладают взаимодействия сорбат-сорбент, модификатор-сорбент, сорбат-модификатор, указанная зависимость имеет следующий вид:

$$\frac{1}{k^1} = \frac{\left[1 + \left(K_M - 1\right) \cdot M_m\right] \cdot \left(1 + K_{SM} \cdot M_m\right)}{\Phi \cdot K_S} = a_0 + a_1 \cdot M_m + a_2^{'} \cdot M_m^2 \qquad (3)$$

В случае, когда в системе преобладают взаимодействия сорбат-сорбент, модификатор-сорбент, модификатор-модификатор – зависимость коэффициента удерживания от мольной доли модификатора передается соотношением (4):

$$\frac{1}{k^1} = \frac{\left[1 + \left(K_M - 1\right) \cdot M_m - 2K_{MM} \cdot M_m^2\right]}{\Phi \cdot K_S} = a_0 + a_1^{'} \cdot M_m + a_2^{''} \cdot M_m^2 \qquad (4)$$

где k' - коэффициент емкости; Φ - фазовое отношение (отношение объемов стационарной фазы (СФ) к ПФ); K_S и K_M – константы адсорбционного равновесия сорбата и модификатора, K_{SM} и K_{MM} – константы, отражающие процессы сольватации молекул сорбата и ассоциации молекул модификатора в растворе, M_m- мольная доля модификатора в подвижной фазе, индексы M и S относятся к подвижной и неподвижной фазам.

Поскольку сорбаты имеют одну природу, а состав элюента в каждой серии опытов оставался неизменным, изменение удерживания водорастворимых витаминов обусловлено взаимодействиями сорбат-сорбент и модификатор-сорбент (уравнение 2). Функциональная зависимость по типу доминирующих в системе межмолекулярных взаимодействий сорбат-сорбент и модификатор-сорбент и изменению закономерностей удерживания сорбатов, связанных с составом бинарного элюента, адекватно описывается полиномом первой степени.

Этот тип зависимости свидетельствует о том, что удерживание сорбатов на поверхности сорбента осуществляется за счет непосредственного контакта неполярного сорбента и полярных функциональных групп молекул сорбатов.

Как видно из таблицы 1 увеличение содержания модификатора в ПФ (ацетонитрила, метанола и тетрагидрофурана) приводит к примерно одинаковому уменьшению удерживания витаминов, следовательно, селективность разделения витаминов зависит, в основном, от концентрации модификатора. При элюировании витаминов метанолом и тетрагидрофураном наблюдается формирование размытых в тыловой области асимметричных хроматографических пиков A_s>1,5. Размывание и перекрывание хроматографических зон определяемых витаминов затрудняет их количественную идентификацию и, как следствие, эффективность разделения малая (R_s<0,13), тогда как при элюировании ацетонитрилом, особенно, при содержании модификатора 5 об %, эффективность разделения очень высока (R_s=0,13), а фактор асимметрии приближается к оптимальным значениям 0,7<A_s<1,5.

Таким образом, нами показано, что хроматографическая система вода-ацетонитрил - Simmetry-C_{18} обладает высокой избирательностью сорбента и хорошей эффективностью разделения витаминов.

Таблица 1

Зависимость коэффициентов емкости, асимметрии и разрешения пиков витаминов от природы и мольной доли органического модификатора в бинарной водно-органической подвижной фазе

Модификатор		k^1						A_s						R_s				
Концентрация, С (%)	Мольная доля, $M_m \cdot 10^2$	B_1	B_2	B_3	B_5	B_6	B_9	B_1	B_2	B_3	B_5	B_6	B_9	B_3/B_1	B_1/B_6	B_6/B_5	B_5/B_9	B_9/B_2
Ацетонитрил-вода																		
0,1	0,26	15,9	95,3	10,0	70,5	62,8	86,3	3,9	3,7	4,1	4,0	3,2	2,1	8,5	14,6	9,4	14,0	15,3
0,6	1,61	11,6	81,7	7,8	51,7	43,5	51,5	3,6	3,1	3,2	3,3	2,9	1,8	3,7	8,5	7,0	13,2	11,9
2,0	5,20	9,5	65,5	5,6	42,1	31,2	40,3	2,5	2,7	2,3	2,8	1,8	1,6	2,5	2,9	5,9	9,4	6,1
5,0	13,00	5,7	50,7	3,7	31,5	20,2	27,1	1,3	1,5	1,1	1,3	1,1	1,2	1,3	1,3	4,9	1,7	2,8
8,0	20,80	3,0	31,0	2,1	19,8	8,6	16,0	1,1	1,2	1,0	1,1	0,9	1,1	0,4	0,8	2,8	1,1	1,6
Тетрагидрофуран-вода																		
0,1	0,16	3,2	86,1	2,0	67,0	57,9	72,0	3,6	3,9	4,6	4,7	3,2	2,5	0,09	0,1	0,03	0,06	0,09
0,6	0,94	2,5	73,2	1,5	35,2	28,7	51,5	2,5	3,3	4,1	4,3	2,9	1,9	0,03	0,08	0,08	0,03	0,07
2,0	3,10	2,4	59,7	1,2	26,3	20,6	31,2	2,1	2,5	3,3	3,8	2,1	1,3	0,02	0,05	0,07	0,02	0,05
5,0	7,73	1,2	41,8	0,9	19,9	15,1	20,9	1,9	1,7	2,9	2,6	1,5	1,1	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03
8,0	12,40	1,0	24,2	0,5	4,6	3,9	15,5	1,2	1,1	1,5	1,7	0,9	0,7	0,03	0,02	0,01	0,00	0,01
Метанол-вода																		
0,1	0,15	14,4	92,5	12,0	58,0	47,9	69,2	3,7	3,5	4,2	4,7	3,1	2,0	0,36	0,91	0,36	0,61	0,59
0,6	0,60	10,2	81,4	9,5	43,7	18,5	48,8	2,2	2,9	3,9	4,3	2,7	1,5	0,23	0,54	0,23	0,48	0,41
2,0	3,00	8,1	67,8	7,2	31,2	12,7	29,6	1,8	2,6	2,9	3,8	1,9	1,3	0,16	0,26	0,15	0,32	0,23
5,0	7,50	6,5	52,6	5,9	19,1	9,7	20,2	1,5	1,1	2,6	2,6	1,2	1,1	0,08	0,12	0,09	0,19	0,15
8,0	12,00	4,3	32,4	3,5	6,1	5,8	9,7	0,9	0,9	1,3	1,8	0,8	0,8	0,05	0,08	0,05	0,11	0,09

Проверка правильности расчетов проведена независимым методом с использованием программы ACD-Lab/Log P Version 1.0, позволяющей по химическим формулам соединений рассчитывать логарифмы коэффициентов удерживания витаминов B_2, B_3, B_9. В таблице 2 представлены значения коэффициентов удерживания водорастворимых витаминов, рассчитанные по уравнению (2), по программе и литературные данные.

Таблица 2

Значения логарифмов коэффициентов удерживания водорастворимых витаминов

Витамин	Значения логарифмов удерживания		
	Рассчитанные по уравнению (2)	По программе ACD-Lab/Log P Version 1.0	Литературные данные [1]
B_1	0,76	-	0,95
B_2	1,71	-3,26 ± 0,72	-
B_3	0,57	0,82 ± 0,23	-
B_5	1,49	-	-
B_6	1,31	-	1,32
B_9	1,43	-2.29 ± 0.50	-

Как видно из таблицы 2, рассчитанные по уравнению 2 коэффициенты сопоставимы с литературными данными, но имеются отличия со значениями рассчитанными программой. Это, видимо, объясняется тем, что программой ACD-Lab/Log P Version 1.0 не учитывается влияние растворителя и модификатора.

Нами были выбраны условия хроматографического определения водорастворимых витаминов (таблица 3).

Таблица 3

Условия хроматографического определения водорастворимых витаминов

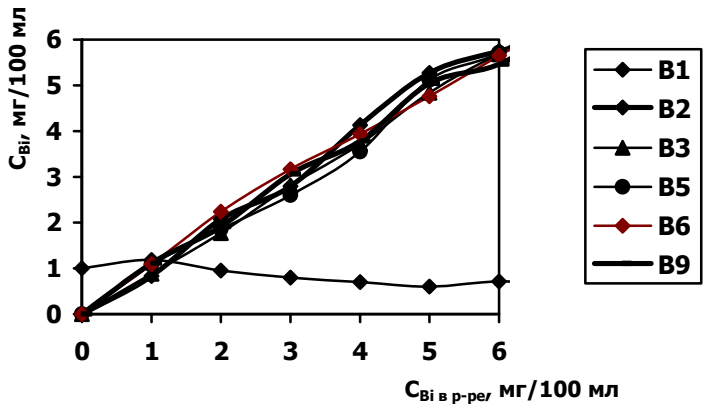
Колонка Simmetry-C18	∅ 3,9×150 мм с сорбентом, размер зерна которого равен 5 мкм
Подвижная фаза	водно-ацетонитрильная
Скорость потока подвижной фазы	1 $см^3$/мин
Температура термостата колонки	30 ^0C
Объем вводимой пробы	20 мкл
Детектирование в диапазоне длин волн	200-400 нм

Было изучено взаимное влияние водорастворимых витаминов (B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_9) и проведен расчет предельно допустимых их соотношений, при которых мешающее влияние не сказывается.

Изучение взаимодействия в работе выполнено в двух вариантах: построение градуировочного графика одного витамина при постоянной концентрации в растворе всех остальных и наоборот: при постоянной концентрации одного и изменении концентрации всех остальных водорастворимых витаминов группы В.

Концентрационные зависимости B_2, B_3, B_5, B_6, B_9 в рабочем диапазоне концентраций в присутствии витамина B_1 представлены на рисунке1. Концентрации витаминов изменяли от 1,0 мг до 7,0 мг на 100 мл. Концентрация витамина B_1 составляла 1,0 мг в 100 мл.

[1]An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B_1, B_6, B_{12}, in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography// Markopoulou C.K., Kagkadis K.A., Koundourellis J.E.//J. Pharm. and Biomed. Anal.-2002-Vol.30-N 4.-P. 1403-1410.



1410.

Рис. 1. Концентрационные зависимости водорастворимых витаминов B_2, B_3, B_5, B_6, B_9 в присутствии витамина B_1

Из графика видно, что концентрационные зависимости сохраняют линейность в рабочем диапазоне концентраций, при этом аналитический сигнал витамина B_1 уменьшается при увеличении содержания отдельных компонентов в пробе. Линейный характер зависимостей подтверждается результатами корреляционного анализа.

Нами проведена оценка систематической погрешности определения витаминов методом ВЭЖХ.

Выражение для систематической погрешности можно записать как:

$$\rho = \frac{C_i - C_o}{C_o}\ , \qquad (5)$$

C_i – определяемое содержание витамина B_i в присутствии сопутствующих витаминов,

C_o – содержание витамина B_i в пробе.

Зависимость изменения погрешности определения витамина B_1 от соотношения содержания витаминов указывает на необходимость проведения процедуры оценки предельных соотношений водорастворимых витаминов при заданном значении систематической погрешности.

При взаимодействии компонентов в многокомпонентном концентрате оценка предельных соотношений водорастворимых витаминов проведена на основе экспериментальных зависимостей хроматографического сигнала определяемого витамина от его содержания в растворе и от содержания сопутствующих витаминов. На рис. 2 представлены номограммы зависимостей концентрации витамина B_i от соотношения витаминов в растворе при заданной погрешности определения ρ = 0,15. На номограмме четко выделяется область предельных соотношений концентраций от 0,03 до 0,20, в которой возможно с погрешностью ρ = 0,15 уверенно определять заданные содержания витаминов.

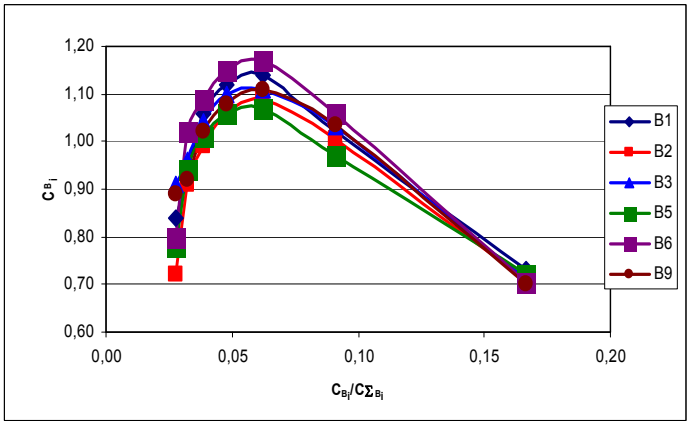


Рис. 2. Зависимость концентрации витамина B_i от соотношения витаминов в растворе при заданной погрешности определения ρ = 15%

Таким образом, получены предельные соотношения водорастворимых витаминов для одновременного их определения методом ВЭЖХ, которые удовлетворяют содержанию их в реальных пробах БАД.

На основе проведенных исследований и расчетов предельных соотношений водорастворимых витаминов в пробе разработан алгоритм методики количественного определения водорастворимых витаминов группы В в БАД, пищевых продуктах и премиксах.

Глава 4 посвящена исследованию влияния pH раствора при подготовке проб модельных смесей, содержащих витамины B_1, B_2 - 0,025 %, B_3 – 0,1 %, B_5, B_6 – 0,05 % и B_9 – 0,002 % на результаты определения витаминов. Полученные результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты содержания определяемых витаминов при различной кислотности среды на стадии пробоподготовки

pH / Содержание, %	3	4	5	6	7	8	9	10
B_1	0,025	0,0235	0,023	0,02	0,019	0,018	0,018	0,017
B_2	0,025	0,024	0,0235	0,015	0,013	0,014	0,016	0,015
B_3	0,11	0,10	0,09	0,08	0,08	0,07	0,07	0,06
B_5	0,049	0,048	0,048	0,042	0,039	0,038	0,036	0,035
B_6	0,051	0,05	0,049	0,044	0,039	0,037	0,036	0,037
B_9	0,0019	0,0018	0,0017	0,0016	0,0015	0,0016	0,0018	0,002

Зависимость определяемой концентрации витаминов от pH раствора представлена на рис. 3- 4.

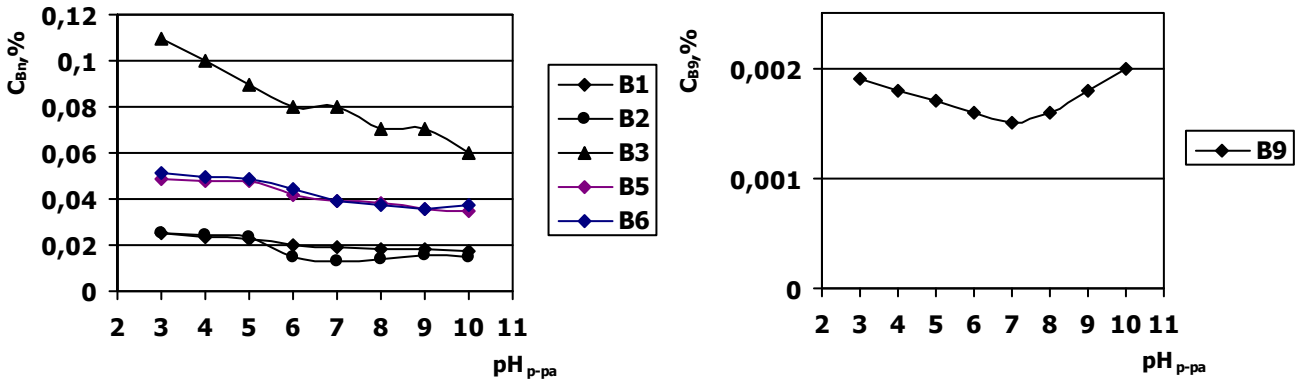


Рис. 3. Зависимость определяемой концентрации витаминов B_1,B_2,B_3,B_5,B_6,B_9 от pH раствора

Как видно из результатов, представленных в таб. 4, графика, аналитический сигнал витаминов B_2, B_9 в нейтральной среде уменьшается. Максимальное значение отклика для витаминов B_1,B_2,B_3,B_5,B_6 наблюдается при pH =3. При pH 8-10 лучше всего переходит в раствор витамин B_9. При pH 3 наблюдается незначительное занижение содержания витамина B_9. Наиболее благоприятной для определения витамина B_9 является среда с pH от 8 до 10. Однако, при pH=3 величина аналитического сигнала уменьшается не более, чем на 5%.

Таким образом, оптимальным значением pH раствора для определения витаминов B_1, B_2, B_3, B_5, B_6 и B_9 является 3, при котором все шесть водорастворимых витаминов максимально переходят в раствор в процессе пробоподготовки.

Было изучено поведение витаминов на модельных смесях с разной органической матрицей, состав модельных смесей был приближен к реальным объектам. В качестве

матрицы использовали соевый протеин, сахар, рыбий жир и яблочный пектин. Графики зависимости относительного стандартного отклонения содержания витамина от его концентрации представлены на рис. 4.

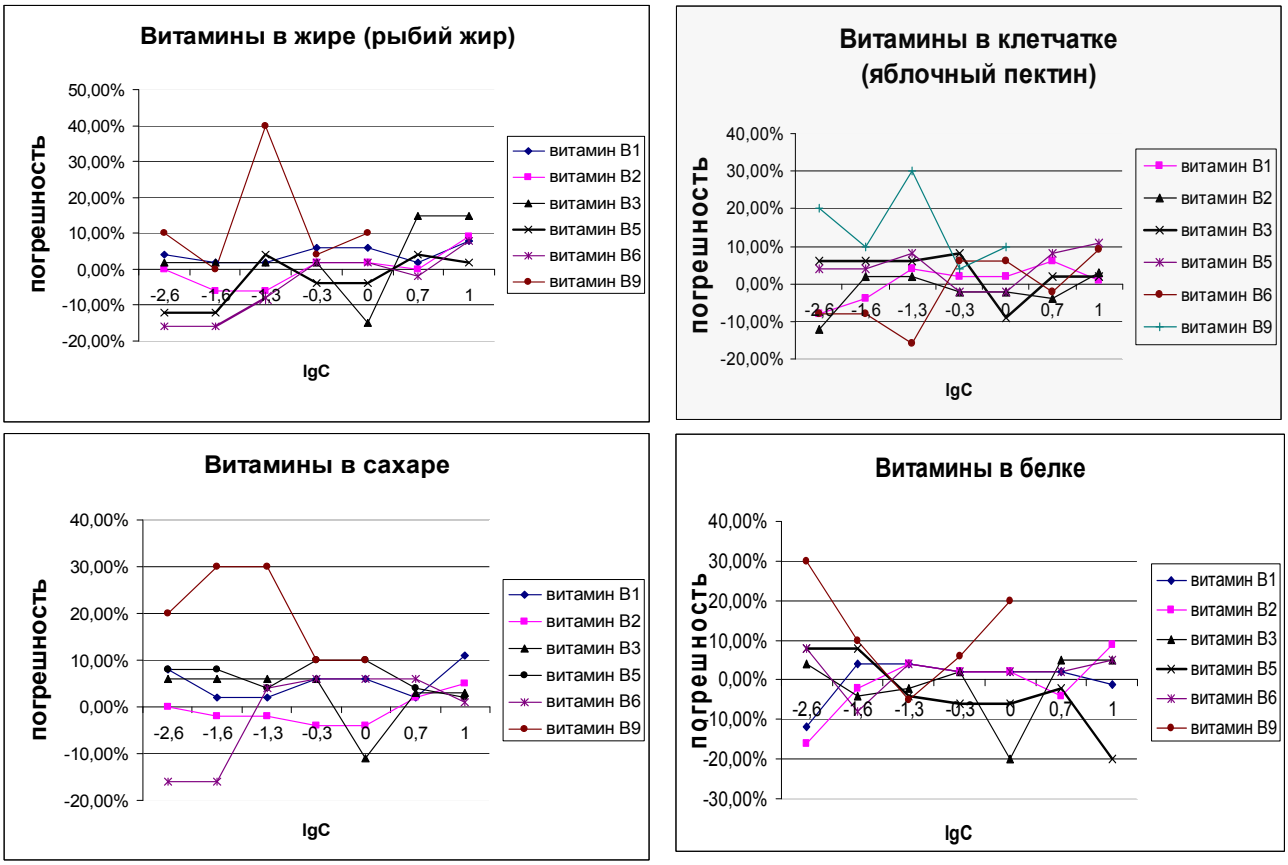


Рис. 4. Оценка мешающего влияния органической матрицы при определении ВРВ и оценка предела обнаружения определяемых содержаний витаминов

Как видно из графиков, стандартное отклонение определяемого содержания большинства водорастворимых витаминов не превышает 20 %. Значительное отклонение (40 %) для витамина B_9 объясняется влиянием органической матрицы. Поэтому на примере витамина B_9 была проведена оптимизация условий подготовки проб при определении водорастворимых витаминов.

Предложена схема алгоритма оптимизации пробоподготовки БАД при определении водорастворимых витаминов методом ВЭЖХ:

- Выбор композиционных факторов и параметров оптимизации планирования эксперимента
- Математическое планирование проведения эксперимента
- Проведение хроматографического эксперимента в соответствии с выбранным объектом
- Построение расширенной матрицы планирования
- Проверка адекватности выбранной математической модели эксперимента

Поиск оптимальных условий пробоподготовки проведен с помощью факторного планирования эксперимента на примере определения фолиевой кислоты (витамин B_9) в витаминизированном премиксе 1-03. В качестве параметра оптимизации выбрано значение содержания витамина B_9 в пробе. Варьируемыми факторами выбраны: объем соляной кислоты (X_1), концентрация соляной кислоты (X_2), температура УЗ-ванны и время УЗ-обработки. Исследуемые факторы на основном и двух уровнях представлены в таблице 5.

Таблица 5

Условия факторного планирования эксперимента

№	Фактор	Основной уровень	Интервал варьирования	Верхний уровень	Нижний уровень
	X_i	x_{0i}	Δx_i	$x_{0i}+\Delta x_i$	$x_{0i}-\Delta x_i$
1	Объем соляной кислоты (X_1), $см^3$	10	5	15	5
2	Концентрация соляной кислоты (X_2), М	0,1	0,05	0,15	0,05
3	Температура УЗ-ванны, ^oC	65	10	75	55
4	Время УЗ-обработки, мин.	20	15	35	5

После проверки значимости коэффициентов по критерию Стьюдента и адекватности модели по критерию Фишера, получено уравнение регрессии, адекватно описывающее поведение исследуемой системы (уравнение 5):

$$Y^* = 0,196 + 0,018X_1 + 0,0198X_3 + 0,1144\ X_4 + 0,016\ X_1X_2 + 0,016\ X_1X_3 + 0,0098\ X_1X_4 + 0,012\ X_2X_4 \quad (6)$$

Для поиска оптимума функции отклика нами применен метод крутого восхождения, исследование поверхности отклика в районе экстремума проведено с использованием центрального ортогонального композиционного планирования. Обработка опытных данных для получения математической модели проведена методами классического регрессионного и корреляционного анализа, в результате нами выбраны оптимальные условия пробоподготовки:

- Объем соляной кислоты - 10 $см^3$
- Концентрация соляной кислоты - 0,1 М
- Температура УЗ-ванны - 65 ^oC
- Время УЗ-обработки - 20 мин.

При определении водорастворимых витаминов группы В в пробах БАД, обогащенных пищевых продуктов и премиксов методом ВЭЖХ альтернативой способу подготовки проб по ГОСТ Р 50929-96 и НД является предложенный нами алгоритм, показанный на рис.5.

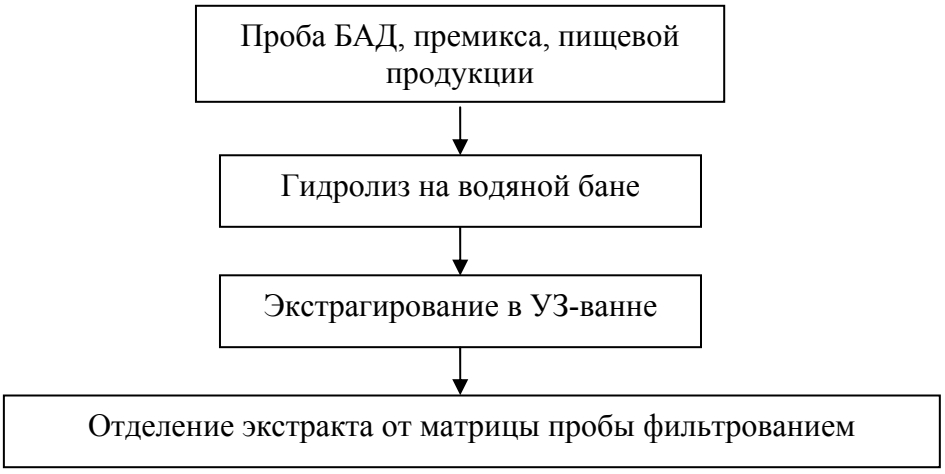


Рис. 5. Схема подготовки пробы на содержание водорастворимых витаминов в пробах БАД, премикса, пищевой продукции

Этапы процесса пробоподготовки с УЗ - интенсификацией для определения витаминов в различных объектах представлены в табл. 6.

Таблица 6

Этапы и условия пробоподготовки для определения витаминов методом ВЭЖХ

№	Содержание этапов пробоподготовки	Условия
1	Взятие навески образца	Масса навески до 1,0 г
2	Гидролиз на водяной бане	Время гидролиза - 20 минут, объем 0,1 М HCl -10 $см^3$
3	Экстрагирование в УЗ-ванне	Время экстрагирования - 20 минут, t=65 ^{0}С, частота 35 кГц
4	Отделение экстракта от матрицы пробы фильтрованием	Фильтр с размером пор 0,45 мкм

Для оценки эффективности предложенного способа пробоподготовки результаты определения витамина B_6 в ряде объектов были сопоставлены с данными, полученными с использованием пробоподготовки по ГОСТ Р 50929-96.

Таблица 7

Влияние УЗ- воздействия на время пробоподготовки и выход витаминов пробах БАД, обогащенных пищевых продуктов и премиксов методом ВЭЖХ (n=3, P=0,95)

Объект	Масса, г	Содержание витамина B_6, %		Время УЗ-обработки, мин	Время проведения анализа, мин	
		Подготовка по ГОСТ Р 50929-96	Подготовка с УЗ-воздействием		без УЗ	с УЗ
БАД «Дискавери»	0,32	0,09	0,11	20	60	45
Витаминные премикс 1-03	0,13	1,07	1,08	20	60	45
Суп «Гороховый»	1,87	0,0035	0,0050	20	60	45
Субстанция витамина B_6	0,01	99,0	99,0	10	45	30

Как видно из табл. 7, применение УЗ-воздействия на стадии растворения пробы ускорило разложение БАД, супа и премикса (быстро достигается гомогенизация пробы). Таким образом, применение УЗ-воздействия позволило сократить в целом время анализа на 15 % с улучшением метрологических характеристик.

Глава 5. На основе проведенных исследований был предложен алгоритм методики определения водорастворимых витаминов B_1, B_2, B_3 (никотинамид, РР), B_5, B_6, и B_9 (фолиевая кислота).

В качестве элюента (подвижной фазы) выбрана смесь водных растворов гептансульфоната натрия и калия фосфорнокислого однозамещенного (1,0 г гептансульфоната натрия и 3,40 г калия фосфорнокислого однозамещенного на 1000,0 $см^3$ воды). Оптимальное значение кислотности раствора устанавливали с помощью ортофосфорной кислоты до значения pH 2,5-3,0. Растворы дегазировали и фильтровали через фильтр с размером пор 0,45мкм.

При выполнении анализа навеску анализируемого образца переносили в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, прибавляли 10 $см^3$ 0,1 М соляной кислоты и обрабатывали смесь на ультразвуковой бане в течение 20 минут при температуре 65^{o}С. Охлаждали смесь до комнатной температуры, прибавляли 30-35 мл подвижной фазы в соотношении А:В 80:20

(раствор А-смесь водных растворов гептансульфоната натрия и калия фосфорнокислого однозамещенного; раствор В-ацетонитрил) и помещали в ультразвуковую баню на 5 минут, после чего доводили раствор подвижной фазой до метки и фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

При использовании выбранных условий хроматографического определения была экспериментально получена линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации витаминов в растворе в широком диапазоне концентраций. Достигнуто четкое разделение витаминов в градиентном режиме для водорастворимых витаминов и изократическом - для жирорастворимых витаминов. Количественное определение витаминов проводили в пробе методом внешнего стандарта (рис. 6,7).

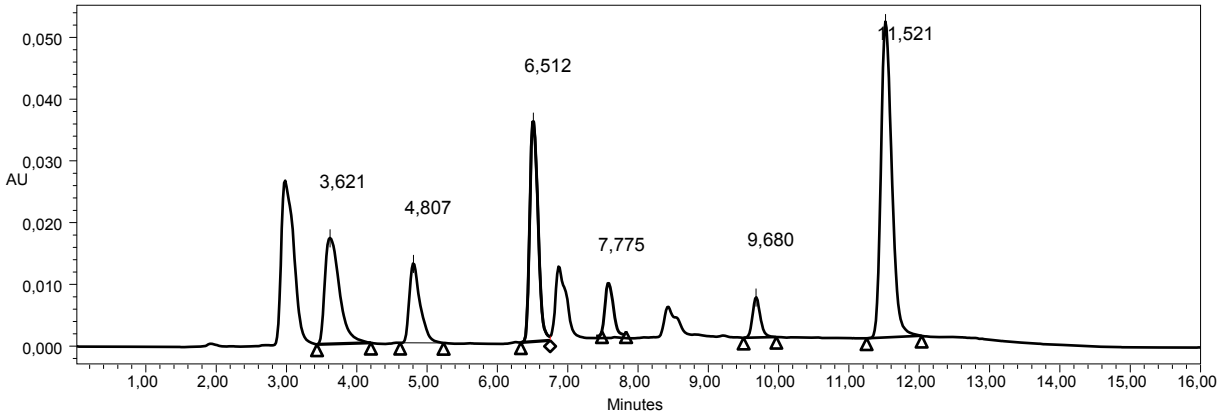


Рис. 6. Хроматограмма витаминного премикса. Время удерживания витамина B_3 (никотинамид)- 3,621 мин., B_1 - 4,807 мин., B_6 - 6,512 мин., B_9 - 9,680 мин.,B_2 - 11,521 мин., B_5 (пантотенат кальция)- 7,775 мин.

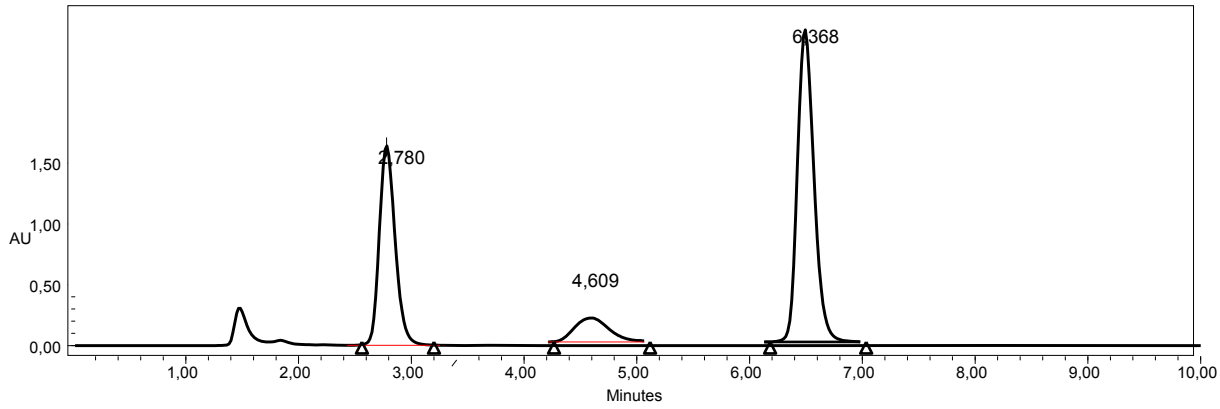


Рис. 7. Хроматограмма витаминного премикса. Время удерживания витамина А - 2,780 мин., D_3 - 4,609 мин., Е - 6,368 мин.

Полученные характеристики хроматографического разделения (время удерживания, критерий разделения) и длины волн витаминов представлены в таблице 8.

Таблица 8

Характеристики хроматографического разделения и детектирования витаминов (n=6; P=0,95)

Витамин	Время удерживания, мин.	Критерий разделения	Длина волны, нм
1	2	3	4
B_1	4,81±0,07	4,8	246
B_2	11,52±0,07	5,2	267
B_3	3,62±0,09	6,3	261
B_5	7,78±0,08	6,3	200

1	2	3	4
B_6	6,51±0,07	7,5	291
B_9	9,68±0,09	7,5	283
A	2,78±0,08	6,2	325
E	6,37±0,07	4,9	284
D_3	4,61±0,09	7,5	265

На основе проведенных исследований были разработаны методики одновременного количественного определения водорастворимых витаминов (B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_9) в градиентном режиме и жирорастворимых (A, E, D_3) в изократическом режиме хроматографирования и достигнуто четкое разделение витаминов. Полученные результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9

Результат определения водорастворимых витаминов в премиксах, БАД и пищевых продуктах (P=0,95, n=15)

Объект анализа	Кол-во	B_1	B_2	B_3	B_5	B_6	B_9
ВМ премикс 5-03	Заложено по рецептуре, %	0,374	0,345	3,235	-	0,408	0,032
	Определено, %	0,40± 0,06	0,36± 0,06	3,20 ± 0,24	-	0,41± 0,05	0,028 ± 0,006
В премикс 1-03	Заложено по рецептуре, %	0,627	0,627	0,715	-	0,77	0,23
	Определено, %	0,65± 0,11	0,64± 0,09	0,72± 0,05	-	0,74 ± 0,09	0,20 ± 0,05
БАД «Глазорол»	Заложено по рецептуре, %	0,1	0,23	1,0	0,6	0,2	0,02
	Определено, %	0,098± 0,007	0,23± 0,04	1,08 ± 0,11	0,71 ± 0,13	0,21 ± 0,04	0,025 ± 0,006
БАД «Мемори райз»	Заложено по рецептуре, %	0,1	-	1,0	0,5	0,2	0,02
	Определено, %	0,11± 0,03	-	0,98 ± 0,04	0,482 ± 0,038	0,20 ± 0,05	0,019 ± 0,002
Каша пшеничная	Заложено по рецептуре, %	0,0016	-	-	-	0,0017	-
	Определено, %	0,0015± 0,0002	-	-	-	0,0015± 0,0002	-

Проверка правильности разработанной методики определения витаминов подтверждена сравнением с другими методами определения витаминов, результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10

Сравнение различных методов количественного определения витаминов, %

Проба	Определяемый витамин	ВЭЖХ	ИВ	СФМ
1	2	3	4	5
Витаминно-минеральный премикс 5-03	B_6	0,39±0,05	-	0,35±0,04
БАД «Мемори райз»	B_1	0,104±0,015	0,098±0,029	-

1	2	3	4	5
Витаминный премикс 1-03	А	0,98±0,01	-	1,12±0,34
БАД «Супер шилд»	Е	2,35±0,19	2,29±0,19	-

На основании проведенных исследований разработаны многоэлементные методики КХА БАД на содержание водо- и жирорастворимых витаминов, которые прошли метрологическое согласование и аттестацию в аккредитованной метрологической службе Томского политехнического университета и внесены в государственный федеральный реестр методик выполнения измерений, допущенных к применению в сфере государственного метрологического контроля и надзора.

Определены диапазоны измеряемых концентраций витаминов, а также диапазоны приписанных характеристик погрешности витаминов группы В и жирорастворимых витаминов (таблица 11).

Таблица 11

Диапазон измеряемых концентраций и приписанные характеристики погрешности

Компонент	Диапазон измеряемых концентраций, % масс.	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости), %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), %
Витамин B_1	от 0,005 до 5,0	4	7
Витамин B_2	от 0,005 до 5,0	5	7
Витамин B_3	от 0,10 до 10,0	2	4
Витамин B_5	от 0,05 до 5,0	4	8
Витамин B_6	от 0,05 до 5,0	3	6
Витамин B_9	от 0,002 до 0,5	7	12
Витамин А	от 0,03 до 0,2	3	5
Витамин Е	от 0,1 до 1,0	2	4
Витамин D_3	от 0,01 до 0,1	11	15

Сравнение нормативных документов по определению водорастворимых витаминов (таблица 12) позволило выявить достоинства разработанной методики.

Таблица 12

Сравнение способов определения витаминов группы В в различных объектах

Параметры	ГОСТ Р 50929-96	НД 42-11946-01	Руководство Р 4.1.1672-03	ФР.1.31.2005.01917, МУ 08-47/185
1	2	3	4	5
Виды продукции	Премиксы	Премиксы	БАД	БАД, премиксы, пищевые продукты
Определяемые витамины	B_1,B_2,B_3	B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_9	B_1, B_2, B_6	B_1,B_2,B_3, B_5, B_6, B_9
Диапазон определяемых концентраций, %	B_1-0,005-0,05 B_2-0,1-0,2 B_3-0,02-0,40	B_1-0,452-0,576 B_2- 0,396-0,484 B_3-3,960- 4,840 B_5-2,250-2,750 B_6-0,483-0,590 B_9-0,090 -0,115	Не указаны	B_1- 0,005-5,0 B_2- 0,005-5,0 B_3-0,10-10,0 B_5-0,05-5,0 B_6-0,05-5,0 B_9-0,002-0,5
Время пробоподготовки	45 минут	45 минут	35 минут	25 минут

1	2	3	4	5
Наличие характеристик погрешности	Отсутствуют	Отсутствуют	δ, σR	Δ , Δ c, δ, σR
Наличие нормативов контроля	Отсутствуют	Отсутствуют	Кд	Rл, Кд

Как видно из таблицы, разработанная и аттестованная методика позволяет определять водорастворимые витамины во всех группах продукции (премиксы, БАД, пищевые продукты), расширен спектр определяемых витаминов и диапазоны их концентраций, сокращено время пробоподготовки и, тем самым, улучшены метрологические характеристики.

Разработанные методики используются для оптимизации и усовершенствования технологии производства продукции компании «Артлайф», что позволяет одному из самых крупных российских производителей БАД и пищевых продуктов, обогащенных биологически активными веществами (БАВ) подтверждать высокое качество своей продукции.

Выводы

1. Исследованы условия определения водорастворимых витаминов группы В методом ВЭЖХ при элюировании бинарными водосодержащими подвижными фазами на основе ацетонитрила, тетрагидрофурана и метанола. Рассчитаны коэффициенты емкости, асимметрии и разрешения пиков витаминов с применением универсальной квазихимической модели удерживания в ВЭЖХ. Установлено, что оптимальное значение параметров удерживания витаминов наблюдается при содержании модификатора - 5 об. %.
2. Сделана сравнительная оценка коэффициентов удерживания водорастворимых витаминов, рассчитанных различными методами: по программе ACD-Lab/Log P Version 1.0 и с применением универсальной квазихимической модели и проведено их сопоставление с литературными данными. Выбраны условия хроматографического определения водорастворимых витаминов группы В: колонка Simmetry-$C_{18,}$ водно-ацетонитрильный элюент.
3. Исследовано мешающее влияние водорастворимых витаминов и проведен расчет их предельных соотношений при определении методом ВЭЖХ с систематической погрешностью не более 15 %.
4. Изучено влияние органической матрицы в модельных системах на основе белка, сахара, жира и пектина при определении водорастворимых витаминов и проведена оценка предела обнаружения витаминов B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_9 при совместном определении их методом ВЭЖХ. Установлено, что стандартное отклонение определяемого содержания большинства водорастворимых витаминов не превышает 20 %, а для витамина B_9 - 40 %.
5. Разработан алгоритм пробоподготовки, предложена дополнительная стадия УЗ-экстрагирования и проведена ее оптимизация на примере витамина B_9 в БАД, обогащенных пищевых продуктах и премиксах.
6. Разработаны методики количественного химического определения B_1, B_2, B_3, B_5, B_6 B_9, А, Е и D_3 в биологически активных добавках, премиксах и пищевых продуктах. Методики метрологически аттестованы и внесены в Федеральный Реестр МВИ, что подтверждается свидетельствами об аттестации и внедрением в ряде аналитических лабораторий.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Слепченко Г. Б., Вековцев А.А., **Шелеметьева О.В.**//Инверсионно-вольтамперометрический метод контроля качества и безопасности в производстве БАД// Материалы международного симпозиума «Федеральный и региональный аспекты политики здорового питания». Кемерово, –2002. – С.84-85
2. Панова И.И., **Шелеметьева О.В.**, Новикова И.К., Скрынникова Е.В., Даньковых Л.А.// Физико-химические и микробиологические методы контроля качества и безопасности производства БАД// Материалы международного симпозиума «Федеральный и региональный аспекты политики здорового питания». Кемерово, – 2002. – С. 85-87.
3. **Шелеметьева О.В.**, Слепченко Г.Б.//Особенности хроматографического определения биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье, БАД и пищевых продуктах на их основе//Материалы международной конференции «Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий». Томск, -2006.-Т.2-С.152-153
4. **Шелеметьева О.В.**, Сизова Н.В., Слепченко Г.Б.//Проведение сличительных испытаний в растительных экстрактов определения биологически активных веществ методами инверсионной вольтамперометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии//Материалы региональной научно-практической конференции «Электрохимические методы анализа в контроле и производстве». Томск, -2007.-С.57
5. **Шелеметьева О.В.**, Слепченко Г.Б.// Возможности хроматографического контроля биологически активных добавок и пищевых продуктов на содержание биологически активных веществ// Материалы II Всерос. конф. По аналитической химии» с междунар. участием (к юбилею академика Ю.А.Золотова). Краснодар, - 2007. – С. 483.
6. **Шелеметьева О.В.** //Определение флавоноидов в биологически активных добавках к пище методом ВЭЖХ//Сборник материалов Международной выставки и научно-практической конференции «Аналитические методы измерений и приборы в пищевой промышленности». Москва, - 2007.-С. 183-186
7. **Шелеметьева О.В.**, Слепченко Г.Б., Австриевских А.Н.// Контроль содержания водорастворимых витаминов в биологически активных добавках, пищевых продуктах и премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии// Журнал «Заводская лаборатория»-2008.- №6.-С. 6-9
8. Мартынюк О.А., **Шелеметьева О.В.**, Щукина Т.И.// Сравнительный анализ грудного молока на содержание витаминов группы В методами инверсионная вольтамперометрия (ИВ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)// Материалы VII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием «ЭМА-2008». Уфа-Абзаково. – 2008. –С. 72
9. Слепченко Г.Б., Мартынюк О.А., **Шелеметьева О.В.**// Разработка методик определения водорастворимых витаминов// Известия Томского политехнического университета. – 2008. –Т 312.- №3.-С.58-61
10. **Шелеметьева О.В.**, Слепченко Г. Б. // Расчет предельно допустимых соотношений водорастворимых витаминов в методе ВЭЖХ и его реализация на примере анализа БАД// Рефераты докладов II Международного Форума «Аналитика и аналитики». Воронеж ,-2008.- С. 613.
11. Пикула Н.П., **Шелеметьева О.В.** // Особенности разработки и аттестации методик анализа на содержание биологически активных веществ//Материалы VIII научной конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока». Томск, - 2008. – С. 242
12. **Шелеметьева О.В.**, Сизова Н.В., Слепченко Г.Б.//Определение содержания витаминов и биологически активных веществ в растительных экстрактах различными методами// Химия растительного сырья-2009.-№1. С. 113-116

13. **Шелеметьева О.В.**, Макаренко М.А.// Особенности производства и стандартизации экстракта коры ивы// Материалы IV Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». Барнаул. – 2009. –С. 93-94

Соискатель выражает благодарность д.т.н., профессору, директору ООО «Артлайф» Австриевских А.Н. за предоставленную возможность выполнения работы на базе лаборатории предприятия и огромную признательность научному руководителю д.х.н., с.н.с. Слепченко Г.Б., к.х.н., доценту Пикула Н.П. и другим сотрудникам кафедры физической и аналитической химии Томского политехнического университета за постоянное внимание к работе, консультации и помощь в обсуждении результатов.