

МАСЯКОВА ЕЛЕНА НИКОЛАЕВНА

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СМЕСЕЙ
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ХЕМОМЕТРИЧЕСКИХ АЛГОРИТМОВ**

02.00.02 - аналитическая химия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Томск – 2009

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Омского государственного университета им. Ф.М.Достоевского и в лаборатории физиологии и биохимического анализа Государственного научного учреждения «Сибирский научно-исследовательский институт птицеводства» Российской академии сельскохозяйственных наук

Научный руководитель: кандидат химических наук, доцент
Власова Ирина Васильевна

Официальные оппоненты: доктор химических наук
Романенко Сергей Владимирович

кандидат химических наук, доцент
Гавриленко Наталья Айратовна

Ведущая организация: Саратовский государственный
университет им. Н. Г. Чернышевского

Защита состоится 16 декабря 2009 г. в 14 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, ТПУ, 2 корпус, химико-технологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-технической библиотеке Томского политехнического университета по адресу: Томск, ул. Белинского, 53.

Автореферат разослан ____ ноября 2009 г.

Ученый секретарь совета Д 212.269.04

кандидат химических наук, доцент

Гиндуллина Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Традиционно для молекулярного анализа многокомпонентных смесей органических веществ применяют хроматографические методы. Так, смеси водорастворимых витаминов анализируют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализировать несложные смеси можно и без разделения, используя экономичный и экспрессный метод - спектрофотометрию. В этом случае требуется более простое и доступное оборудование, не нужны токсичные растворители. Это весьма важно при проведении технического контроля. Спектрофотометрический анализ неразделенных смесей при наложении спектров поглощения компонентов можно вести, применяя классический метод Фирордта (МФ), но результаты анализа оказываются достаточно точными только для двух- и трехкомпонентных смесей. При увеличении числа компонентов (q) до 4-6 МФ дает неточные результаты. Поэтому для анализа поливитаминных смесей, например, для анализа широко используемых в животноводстве и птицеводстве премиксов, спектрофотометрию практически не используют.

Применение хемометрических алгоритмов, таких как метод множественной линейной регрессии (МЛР) или метод многомерной градуировки (проекция на латентные структуры, PLS), способно расширить возможности спектрофотометрии, чтобы анализировать многокомпонентные смеси. Однако заранее нельзя сказать, какова может быть точность соответствующих методик, особенно в тех случаях, когда, во-первых, имеется неаддитивность светопоглощения компонентов, во-вторых, содержания разных компонентов сильно различаются (на порядок и более).

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было изучение возможности применения некоторых хемометрических алгоритмов (МЛР и PLS) к спектрофотометрическому анализу 4-6-компонентных смесей водорастворимых витаминов и разработка соответствующих методик анализа. В ходе исследования необходимо было решить следующие *частные задачи*:

- оценить возможность применения методов МЛР и PLS для количественного определения витаминов по спектрам поглощения 4-6-компонентных модельных смесей, близких по составу к экстрактам премиксов;

- оценить точность и оптимизировать соответствующие методики анализа (выбор спектральных диапазонов, ограничение объема обучающих наборов и др.);
- подобрать условия для количественного извлечения витаминов из премиксов с учетом времени, температуры и кратности экстракции, а затем разработать методики экспрессного спектрофотометрического анализа премиксов.

Известные методики хроматографического анализа премиксов не позволяют количественно определять все компоненты, обычно определяют только 3 основных витамина (B_5 , B_1 и B_2). Поэтому для оценки правильности результатов спектрофотометрического определения витаминов необходимо было модифицировать методику хроматографического анализа премиксов с учетом свойств индивидуальных витаминов. Затем следовало сравнить метрологические характеристики методик спектрофотометрического и хроматографического определения витаминов и дать рекомендации по применению тех и других методик.

Объектами определения в настоящей работе были следующие водорастворимые витамины: тиамин гидрохлорид (B_1), рибофлавин (B_2), пантотеновая кислота (B_3), никотиновая кислота (B_5), пиридоксингидрохлорид (B_6), викасол (K_3), аскорбиновая кислота (C), биотин (H), цианокобаламин (B_{12}), а также их модельные многокомпонентные смеси. Выбор этих витаминов объясняется тем, что они входят в состав премиксов, выпускаемых промышленностью, и являются важными составляющими полноценного питания.

Тематика работы зарегистрирована во ВНИИЦ (№ ГР 01.200.2 04679), исследования велись при финансовой поддержке Министерства науки и образования (единый заказ-наряд) и Федеральной целевой программы “Интеграция”. Тема исследований является составной частью научно-исследовательской работы, проводимой в ГНУ «Сибирский НИИ птицеводства» в соответствии с научной программой фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению развития агропромышленного комплекса Российской Федерации на 2006-2010 года, задание 07.02.02.

Научная новизна.

1. Показано, что компьютерное моделирование УФ-спектров поглощения смесей витаминов позволяет адекватно прогнозировать случайные погрешности спектрофотометрического анализа этих смесей с применением МЛР и оптимизировать условия анализа;
2. Для повышения точности определения витаминов методом МЛР предложено подбирать для каждого витамина оптимальный диапазон длин волн и рассчитывать его концентрацию по соответствующим спектральным данным;
3. Впервые показаны применимость метода PLS к анализу неразделенных смесей витаминов и возможность быстрого определения 5-6 витаминов с погрешностью до 5% отн. Установлено, что метод PLS применим даже в тех случаях, когда в спектрах имеются участки с отклонением от аддитивности, а содержания компонентов смеси отличаются более чем в 10 раз.
4. Установлено, что разработанные на основе хеометрических алгоритмов экспрессные спектрофотометрические методики определения витаминов в неразделенных смесях по точности не уступают методикам, основанным на использовании ВЭЖХ.
5. Доказано, что оптимизация условий разделения витаминов методом обращенно-фазовой хроматографии (ВЭЖХ) позволяет определять состав более сложных смесей (вплоть до $q = 9$), чем спектрофотометрический анализ с применением метода МЛР. Выявлены оптимальные области применения спектрофотометрических и хроматографических методик анализа

Практическая значимость работы. Выработаны практические рекомендации по применению хеометрических алгоритмов (МЛР и PLS) в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей органических веществ. Разработан ряд спектрофотометрических и хроматографических методик количественного определения витаминов группы В и витамина К в премиксах, некоторые из них внедрены в практику (ГНУ «Сибирский НИИ птицеводства» РАСХН). Выявлены химико-аналитические задачи, которые рекомендуется решать с разделением (ВЭЖХ) и без разделения (спектрофотометрия) поливитаминных смесей.

Положения, выносимые на защиту

1. Принципиальная возможность и целесообразность применения хемометрических алгоритмов (методов МЛР и PLS) для экспрессного спектрофотометрического анализа витаминных смесей.
2. Применимость метода PLS к анализу многокомпонентных смесей витаминов при неаддитивности их спектров поглощения.
3. Алгоритм моделирования УФ-спектров поливитаминных смесей с учетом случайных погрешностей.
4. Выбор условий (спектральных диапазонов) для определения витаминов в многокомпонентных смесях по методу МЛР.
5. Условия разделения и количественного анализа поливитаминных смесей методом ВЭЖХ с определением 6-9 витаминов за один ввод пробы.
6. Разработанные методики спектрофотометрического и хроматографического анализа витаминных смесей (премиксов) и рекомендации по их применению.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на Всероссийской конференции “Менделеевские чтения” (Тюмень, 2005), на международном форуме “Актуальные проблемы современной науки” (Самара, 2005), на VII и VIII Всероссийских конференциях молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям (Красноярск, 2006, Новосибирск, 2007), на Всероссийских конференциях «Аналитика России» (Краснодар, 2007, 2009), на XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007), на VI международном симпозиуме по хемометрике “Современные методы анализа многомерных данных” (Казань, 2008), на Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия под знаком Сигма» (Омск, 2008), на Всероссийской конференции “Аналитика Сибири и Дальнего Востока” (Томск, 2008), ученых советах Сибирского НИИ птицеводства (2005-2008 гг).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ в виде статей и тезисов докладов. Оформлена заявка на патент РФ «Способ определения водорастворимых витаминов в премиксах» (приоритет 02.03.2009) №2009107447/15 (009960).

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературы (160 наименований) и 8 приложений. Работа изложена на 146 страницах текста, содержит 21 рисунок, 31 таблицу.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, обоснован подход к достижению поставленной цели.

Первая глава представляет собой обзор литературы по методам определения витаминов в лекарственных препаратах, биологических объектах, кормах и кормовых добавках. Показано, что известные методики спектрофотометрического и хроматографического анализа витаминных смесей не позволяют решить задачу детального, экспрессного и точного анализа премиксов.

Во второй главе приведены результаты применения методов МЛР и PLS к анализу модельных смесей.

Методика исследования. Основными объектами исследования были четырех-, пяти- и шестикомпонентные смеси витаминов (водные растворы). Исходные растворы индивидуальных витаминов с концентрацией порядка 0,1 мг/мл готовили растворением точной навески реактива квалификации х.ч. (Supelco, США) в бидистиллированной воде. Растворы устойчивы в течение двух месяцев. Рабочие растворы готовили ежедневно, разбавляя исходные в 10, 100 раз 0,01 М раствором HCl. Для приготовления модельных смесей смешивали рабочие растворы в необходимых объемных соотношениях, вплоть до 30-кратного избытка одного из компонентов. Было использовано несколько десятков модельных растворов, состав которых либо отвечал номинальному составу премиксов (табл.1), либо отличался от номинального на $\pm 10\%$ или $\pm 20\%$ по одному или нескольким компонентам.

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре СФ-2000 в кварцевых кюветах (1 см), в диапазоне 200-500 нм с шагом 0,2 нм. Прецизионность измерений в диапазоне значений оптической плотности 0,1 – 0,8 характеризуется коэффициентом вариации (W) порядка 0,5%. По усредненным данным рассчитывали удельные коэффициенты поглощения (k_j^i , мл / мг·см) при разных длинах волн.

Спектры поглощения индивидуальных витаминов в УФ-области сильно перекрываются (рис.1). Проверка показала, что спектры исследованных 4-компонентных смесей аддитивны, а в спектрах более сложных смесей есть участки, где наблюдаются небольшие, но статистически значимые ($\alpha = 0,05$) отклонения от аддитивности. Причиной отклонений может быть образование ионных ассоциатов.

Таблица 1

Модельные смеси «номинального» состава

Моделируемый премикс	q	Концентрация витаминов, мкг/мл					
		B_1	B_2	B_3	B_5	B_6	K_3
-	4	-	2,0	3,4	10,0	1,3	-
Премикс 0,1% на цеолите	5	0,5	2,0	10,0	15,0	2,0	-
Премикс 0,25% на цеолите	6	1,1	2,6	4,4	13,2	1,8	0,9

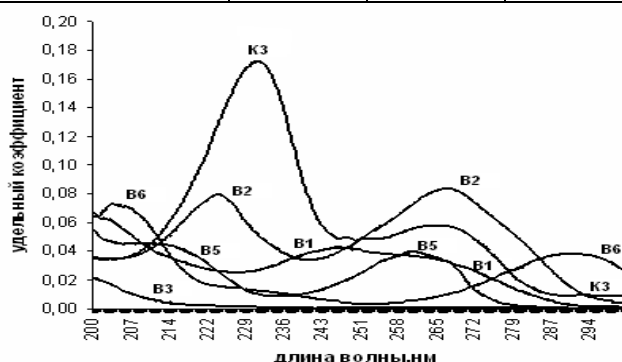


Рис. 1. УФ-спектры поглощения растворов витаминов в 0,01М HCl

Анализ смесей витаминов еще более усложняется ввиду существенных различий вкладов компонентов в оптическую плотность смеси. Расчеты вкладов проводили с учетом концентраций компонентов и их коэффициентов поглощения на разных длинах волн. В исследуемых смесях есть как макрокомпоненты (витамины B_2 , B_5 , B_6), чей вклад составляет десятки процентов, так и микрокомпоненты (например, B_3), вклад которых не превышает 5 %.

Метод множественной линейной регрессии. Расчеты концентраций по методу МЛР выполняли с применением пакета Microsoft Excel (опция “Анализ данных”, подфункция – «Регрессия»). Алгоритм предусматривает решение переопределенной системы алгебраических уравнений. В нашем случае каждая система содержала несколько сот линейных уравнений вида

$$A^i = \sum_{j=1}^q k_j^i \cdot l \cdot c_j \quad (1),$$

где A^i – оптическая плотность раствора смеси при i -ой длине волны, k_j^i – удельный коэффициент поглощения j – го витамина при той же длине волны, а C_j – концентрация этого витамина в растворе.

Непосредственная обработка данных, полученных в широком диапазоне длин волн, приводила к неудовлетворительным результатам анализа: погрешности определения некоторых витаминов методом МЛР иногда достигали 15% отн. и более. Методики анализа оптимизировали подбором для каждого витамина спектральных диапазонов, в которых случайные погрешности измерения аналитического сигнала оказывали наименьшее влияние на результат определения этого витамина. Влияние случайных погрешностей моделировали в ходе компьютерного эксперимента.

Вначале, используя найденные в эксперименте коэффициенты поглощения и задавая концентрации витаминов, моделировали «идеальный» спектр смеси, получая по формуле (1) значения $A_{идеал}$ при каждой длине волны. Затем «возмущали» этот спектр, моделируя случайные погрешности измерений. При этом учитывали сходимость соответствующих коэффициентов поглощения:

$$A_{возм} = A_{идеал} + \sum_{j=1}^q k_j^i \cdot l \cdot S_j \cdot C_j \cdot P \quad (2),$$

где S_j – стандартные отклонения коэффициентов поглощения j -го компонента, P – дробное число (положительное или отрицательное), получаемое с помощью генератора нормально распределенных случайных чисел. Таким образом, получали несколько «возмущенных» спектров каждой смеси. Концентрации компонентов рассчитывали, используя поочередно узкие диапазоны длин волн. При этом применяли один и тот же алгоритм МЛР и то же программное обеспечение, что и при обработке реальных спектров. Затем выбирали для каждого компонента те диапазоны, которые обеспечивали наименьший разброс результатов анализа при повторном моделировании спектров (табл.2).

Выбранные для определения каждого компонента спектральные диапазоны,

как правило, соответствовали максимумам поглощения этого компонента. Лишь для витамина В₃ в компьютерном эксперименте не удалось найти диапазон, позволяющий определять его с погрешностью менее 10% (В₃ дает наименьший вклад в оптическую плотность смесей). Для оптимизации условий его определения применили разностный подход: из оптической плотности смеси вычитали вклад основного компонента - витамина В₅, а в разностном спектре удалось найти интервалы длин волн, на которых В₃ определяется с погрешностью, не превышающей 5% отн.

Таблица 2

Результаты анализа 4-компонентной смеси в случае компьютерного эксперимента (А) и при использовании реальных спектров (Б)

Вита- мин	Диапазоны длин волн, нм	Введено, мкг/мл	А			Б		
			Найде- но, мкг/мл	δ , %	W, %	Найде- но мкг/мл	δ , %	W, %
В ₂	282-301, 367-375	2,40	2,48	3,3	0,1	2,53	5,5	0,1
В ₅	210-232	12,0	11,81	-1,6	3,3	11,72	-2,3	4,9
В ₆	200-230, 370-375	1,60	1,57	-1,6	0,1	1,57	-2,1	0,1
В ₃ *	200-230, 363-375	3,40	3,44	1,2	0,9	3,49	2,7	4,7

* - по разностному спектру

Результаты компьютерного эксперимента согласуются с данными анализа реальных 4-компонентных смесей. Как правило, погрешности анализа и коэффициенты вариации, найденные в ходе проверки, для всех витаминов не превышали 5% отн. Таким образом, в ходе компьютерного эксперимента удалось оптимизировать условия проведения анализа смесей методом МЛР так, чтобы достигалась требуемая точность определения. Изложенный выше способ подбора условий анализа, основанный на проведении компьютерного эксперимента, в известной нам литературе не описан.

Поскольку в спектрах 5- и 6-компонентных смесей были выявлены участки с отклонениями от аддитивности светопоглощения, аналитические диапазоны длин волн выбирали, исключая «неаддитивные» участки (как правило, область 200-220 нм). В случае 5-компонентной смеси, охарактеризованной в таблице 1, три витамина - В₂, В₅, В₆ - можно определять по методу МЛР с использованием одного и того же спектрального диапазона. Еще два витамина - К₃ и В₁

– можно определять с требуемой точностью по разностному спектру в области (220-245, 254-265 нм). В случае 6-компонентных смесей получены результаты, во многом совпадающие с результатами по 5-компонентным смесям (табл.3). Однако витамин В₃ в этих смесях не удастся точно определить и по разностному спектру.

Таблица 3

Результаты определения витаминов методом МЛР в 6-компонентной смеси с использованием узких спектральных диапазонов

Витамин	Введено, мкг/мл	Диапазоны длин волн, нм	Найдено, мкг/мл	$\delta, \%$	W, %
В ₁	0,9	220-245, 254-265	0,87	-3,8	1,7
К ₃	0,7		2,15	2,3	0,6
В ₃	3,5	230-301	4,26	21,8	2,8
В ₅	10,6	220-500	11,02	4,0	0,2
В ₆	1,4		1,38	-1,3	0,5
В ₂	2,1		0,72	2,6	0,5

Очевидно, метод МЛР позволяет определять все витамины лишь в 4-5-компонентных смесях, а в 6-компонентных и более сложных смесях найти содержание всех компонентов таким способом не удастся.

Метод проекции на латентные структуры. Затем к анализу тех же смесей был применен метод многомерной градуировки (PLS). Расчеты вели с использованием программы The UNSCRAMBLER, модуль PLS 2.*

Принцип метода заключается в установлении максимальной ковариации между экспериментальными исходными данными X и переменными Y, значения которых необходимо в будущем предсказывать, причем как можно точнее. В нашем случае X – это матрица спектров смесей, состоящая из m столбцов, равных количеству длин волн, при которых измерена оптическая плотность ($m=300$), и n строк, равных количеству модельных смесей известного состава; Y- матрица концентраций, состоящая из q столбцов (число витаминов) и n строк. Все данные делятся на два набора – обучающий (применяется для построения градуировки), и проверочный, по результатам анализа которого судят о пригодности построенной градуировки.

* Программа была предоставлена компанией CAMO Process AS (Норвегия).

Основная и наиболее трудоемкая задача при построении многомерной градуировки (градуировочной модели) - формирование обучающего набора. Необходимо выбрать такое минимальное число смесей известного состава, которое бы позволило в дальнейшем вести анализ реальных объектов с погрешностью, не превышающей заданный предел. Чтобы выяснить, как связаны правильность определения витаминов с числом смесей в обучающем наборе, были построены несколько градуировочных моделей, и каждая модель применена к анализу смесей из проверочного набора. В качестве примера в таблице 4 приведены относительные погрешности (δ , %) определения витаминов в одной из проверочных 6-компонентных смесей, полученные по разным градуировочным моделям. Оказалось, что использование 13 смесей известного состава для построения градуировки достаточно для получения результатов анализа с погрешностями не более 2% отн. Увеличение объема обучающего набора не приводит к заметному снижению погрешностей. Прецизионность определения витаминов в той же смеси в условиях повторяемости характеризуется коэффициентом вариации порядка 0,1%.

Таблица 4

Зависимость правильности определения витаминов методом PLS от объема обучающего набора

Градуировочная модель	Число смесей, n	Относительная погрешность, δ , %					
		B_1	B_2	B_3	B_5	B_6	K_3
1	7	7,9	7,6	6,9	5,1	7,1	6,9
2	9	7,3	6,1	3,1	5,6	7,2	4,1
3	11	6,1	5,3	-1,0	2,4	1,2	5,2
4	13	-1,2	1,1	-0,6	0,2	-0,8	-1,0
5	21	-1,3	0,7	-0,4	0,2	-0,8	-1,2
6	35	-1,2	0,4	-0,5	0,1	-0,6	-1,0
7	55	-1,3	0,8	-1,3	0,1	-0,6	-1,1

Аналогичные результаты получены для 4 и 5-компонентных смесей. В этом случае для построения градуировок также достаточно использовать не более 11-13 смесей, что обеспечивает правильность определения витаминов на уровне 1-2% отн. Следует подчеркнуть, что в методе PLS и при построении, и при проверке градуировочных моделей используются однотипные смеси, а поэтому влияние отклонений от аддитивности элиминируется.

Несмотря на то, что построить общую градуировочную модель, охватывающую все изученные поливитаминные смеси, не удалось (для каждого типа смесей предпочтительнее строить свою собственную градуировку), преимущества метода PLS несомненны. Основными преимуществами PLS по сравнению с методом МЛР являются следующие:

- не требуется заранее подбирать спектральные интервалы, обеспечивающие требуемую точность определения заданного компонента, или вычитать из спектра анализируемой смеси спектры макрокомпонентов;
- точному определению концентраций компонентов сложных смесей не мешают небольшие отклонения от аддитивности светопоглощения;
- погрешности определения витаминов в одних и тех же смесях существенно меньше. Метод PLS позволяет анализировать модельные смеси с погрешностями, не превышающими 2% отн., либо – при той же точности – анализировать более сложные смеси (6 и более витаминов, в том числе микрокомпоненты).

В третьей главе приведены результаты по разработке и оптимизации хроматографической методики определения водорастворимых витаминов в смесях. Объектами исследования были, помимо названных в предыдущей главе 6 витаминов, дополнительно витамины B₁₂, C и H. Разделение смесей проводили на жидкостном хроматографе LaChrom (Merck-Hitachi) методом обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) на колонке Purospher-RP-18e (250×4,6мм, диаметр зерна сорбента 5 мкм), предколонка Purospher-RP-18e (4×4,6 мм, диаметр зерна сорбента 5 мкм). Данная неподвижная фаза обладает улучшенными свойствами для разделения слабых кислот и оснований, рабочий диапазон pH 2-8.

Известные по литературным данным методики ВЭЖХ-определения водорастворимых витаминов предусматривают применение метанола и ион-парных реагентов (октансульфонаты, додецилсульфонаты). Использование последних необходимо для динамического модифицирования поверхности сорбата, проявляющего ярко выраженные кислотные или основные свойства, в противном случае симметричной формы пиков и качественного разделения получить наверняка не

удастся. Основной недостаток такого рода реагентов – снижение ресурсов колонок, что увеличивает расход времени и средств.

В качестве подвижной фазы был выбран перхлорат лития, обладающий слабо выраженными ион-парными свойствами, и экспериментально доказано, что для достижения заданной степени разделения витаминов и получения симметричных пиков достаточно концентрации LiClO_4 не более 0,005 моль/л. К тому же, такой разбавленный раствор слабо загрязняет колонку, т.е. снимает вышеперечисленные проблемы.

Все изучаемые витамины являются слабыми органическими кислотами, причем сила кислот в водных растворах уменьшается от никотиновой кислоты к биотину в ряду: $\text{B}_5 > \text{C} > \text{B}_1 \approx \text{B}_3 \approx \text{B}_6 > \text{B}_2 > \text{K}_3 > \text{H}$

Учитывая различия в кислотно-основных свойствах витаминов, были подобраны следующие условия хроматографического разделения смесей: элюент А — 0,005 М водный раствор перхлората лития, $\text{pH}=2,5$, элюент В — ацетонитрил. Детектирование производилось на УФ- и флуоресцентном детекторе, со сменой длин волн в процессе хроматографирования, с учетом ранее установленных областей максимального поглощения индивидуальных витаминов и областей флуоресценции витаминов B_2 и B_6 . Для сокращения времени анализа и улучшения характеристик разделения элюирование проводилось в градиентном режиме, профиль которого приведен на рисунке 2. На этом же рисунке приведены длины волн детектирования. Объем вводимой в хроматограф пробы – 40 мкл.

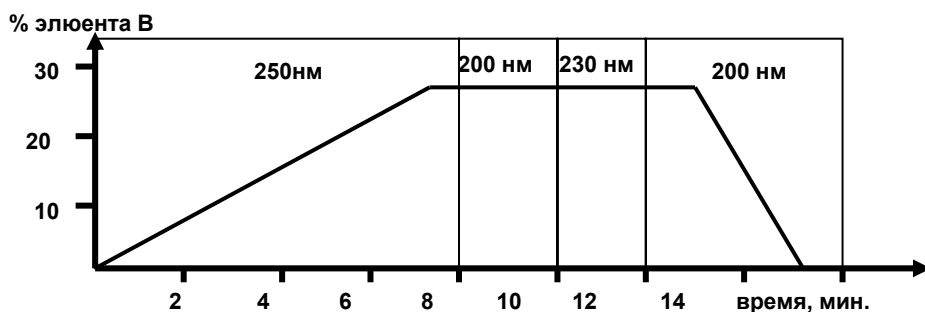


Рис. 2. Профиль градиентного элюирования и длины волн детектирования

Меняя состав элюента и длину волны детектирования, удалось в конечном итоге добиться разделения всех 9 изучавшихся витаминов при единичном вводе

пробы. Критерии разрешения соседних пиков во всех случаях больше 2. На рисунке 3 представлена хроматограмма стандартной смеси витаминов.

В выбранных условиях установлен диапазон линейной зависимости аналитического сигнала – площади хроматографического пика - от концентрации индивидуальных витаминов. Для витамина В₁ он составил 0,5-20 мкг/мл, для В₅ — 0,5-100 мкг/мл, для остальных витаминов - 0,5-50 мкг/мл.

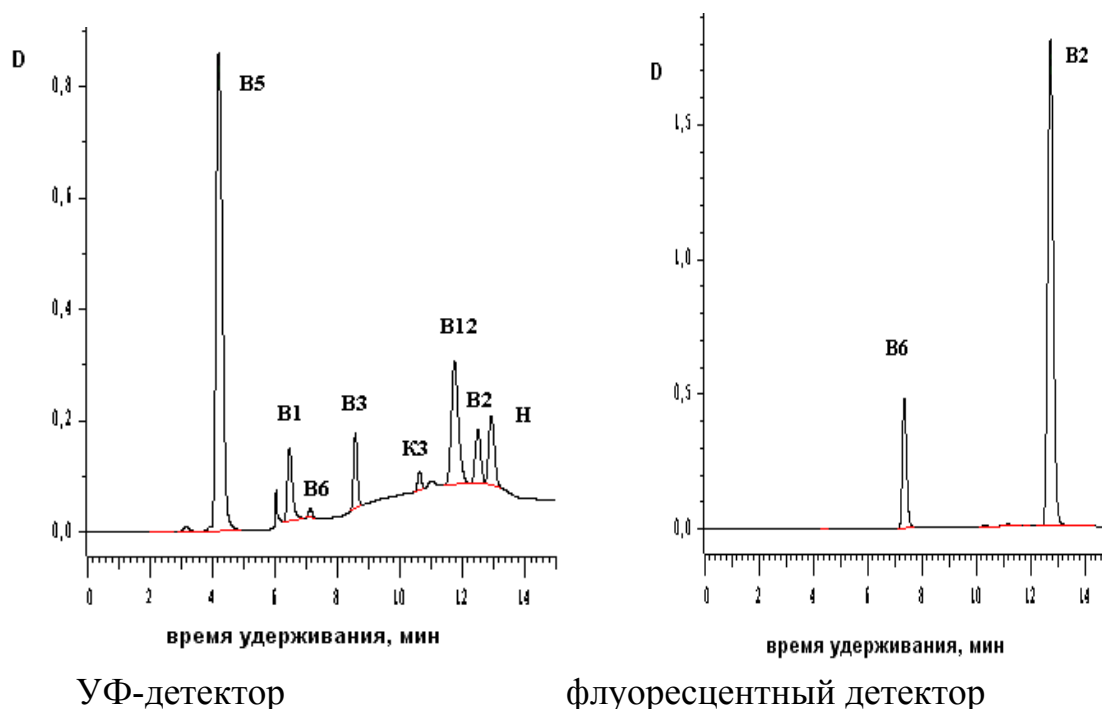


Рис. 3. Хроматограммы модельной смеси витаминов.

Правильность и прецизионность хроматографического определения витаминов в смеси проверяли с помощью модельных смесей (табл. 5). Расчет концентраций вели по градуировочному графику. Соотношение концентраций витаминов в модельных смесях было близко к их соотношению в премиксах. Как видно из приведенных данных, выбранные условия позволяют достаточно точно определять содержания всех компонентов модельной смеси. Витамины С и В₁₂ количественно не определяли, так как в премиксы они не вводятся или их содержание ниже порога чувствительности детектора. Правильность и прецизионность хроматографического определения витаминов в модельной смеси примерно такая же, как при анализе смеси методом МЛР и несколько хуже, чем методом PLS.

Продолжительность хроматографического анализа смеси до 30-40 минут, что в 2-3 раза больше, чем время анализа той же смеси методом PLS.

Таблица 5

Правильность и прецизионность хроматографического определения витаминов в модельной смеси (n = 5, P = 0,95)

Витамин	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	δ , %	W, %
B ₁	3,0	2,9 ± 0,1	- 1,0	4,0
B ₂	10,0	9,9 ± 0,1	-1,2	1,4
B ₃	20,0	20,1 ± 0,04	0,5	1,2
B ₅	100,0	98,6 ± 0,6	-1,4	0,6
B ₆	5,0	4,8 ± 0,5	- 3,2	2,7
K ₃	20,0	19,5 ± 0,1	- 2,5	0,9
H	10,0	10,4 ± 0,4	3,9	3,9

В четвертой главе исследованы условия экстрагирования витаминов из премиксов и приведены результаты анализа экстрактов по разработанным нами методикам. Проведено сравнение метрологических характеристик этих методик. Современные премиксы представляют собой сложную многокомпонентную смесь, содержащую до 13-14 витаминов, не менее семи микроэлементов, а также аминокислоты, антибиотики, ферменты и наполнители различной природы. В качестве наполнителей используются отруби, цеолиты, карбонат кальция (мел) и др. Премиксы подразделяются на витаминные (не содержат микроэлементов), витаминно-минеральные и минеральные (содержат только микроэлементы).

Следовало выяснить, возможно ли применение в качестве экстрагентов тех растворителей, что используются в разработанных нами методиках, а именно – 0,005 М раствора перхлората лития и 0, 01 М раствора соляной кислоты. В качестве объектов анализа были использованы премиксы точно известного состава. Полученные экстракты анализировали методом ВЭЖХ, как описано выше. Соотношение массы премикса и объема экстрагента было подобрано с таким расчетом, чтобы концентрации витаминов в экстракте попадали в диапазон линейности разработанной хроматографической методики. Для каждого экстрагента были изучены следующие факторы: время, температура и кратность экстракции.

Установлено, что увеличение температуры выше 30⁰С нецелесообразно, т.к. приводит к разрушению наиболее нестойких витаминов – В₁ и К₃. Равновесие в системе премикс – экстрагент наступает к 30 минуте. Для полноты извлечения достаточно однократной экстракции. На рисунке 4 приведена зависимость степени извлечения витамина В₁ от времени. Аналогичные зависимости получены и для других витаминов.

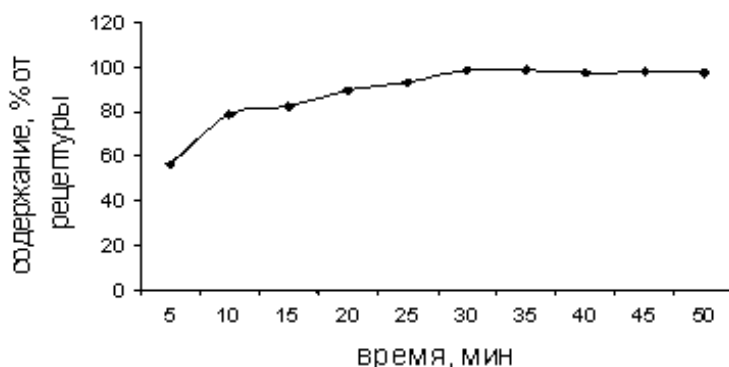


Рис.4. Влияние времени экстракции на степень извлечения витамина В₁ (экстрагент - HCl).

Результаты анализа одного из премиксов, выполненные с использованием двух экстрагентов, приведены в таблице 6.

Таблица 6

**Результаты анализа премикса с разными экстрагентами
(однократная экстракция, n=3, P=0,95)**

Витамин	Содержание по рецептуре, мг/г	Найдено			
		0, 01 М HCl		0,005 М LiClO ₄	
		мг/г	в % от рецептуры	мг/г	в % от рецептуры
В ₅	10	10,5±0,5	105,3	9,3±2,8	93,2
В ₁	0,6	0,6±0,1	97,2	0,5±0,3	78,2
В ₃	3,0	2,8±0,3	93,5	2,7±1,3	88,7
К ₃	1,0	1,0±0,05	101,8	0,7±0,3	67,4
В ₆	1,2	1,23±0,5	104,3	1,0±0,4	83,4
В ₂	3,0	2,8±0,3	93,2	2,4±1,0	81,4

Как видно, лучшие результаты дает использование в качестве экстрагента соляной кислоты - в этом случае содержание найденных витаминов ближе к рецептурным и лучше сходимость результатов. Предложенный способ экстрагиро-

вания витаминов успешно зарекомендовал себя в анализе премиксов на разной основе – мел, цеолиты, отруби.

С целью подтверждения достоверности получаемых результатов были проведены межлабораторные испытания премиксов – совместно с производственно-технологической лабораторией г. Новосибирска (ПТЛ) и Омской ветеринарной лабораторией (ОмВЛ), где анализ премиксов выполняют по методике, изложенной в ГОСТ Р 50929-96, и позволяющей определять только три витамина. Результаты испытаний премиксов (табл. 7) подтверждают правильность данных, получаемых по разработанной нами методике. Данная методика была внедрена в ГНУ «Сибирский НИИ птицеводства». В настоящее время по ней проанализировано более четырехсот премиксов разного состава.

Таблица 7

Сравнительные результаты определения витаминов в премиксе

Витамины	Содержание по рецептуре, мг/г	Найдено, мг/ г		
		Разработанная методика	ПТЛ	ОмВЛ
B ₁	0,1	0,09±0,01	0,1	0,09
B ₂	0,5	0,5±0,1	0,5	0,4
B ₅	3,0	3,0±0,2	2,8	3,2
B ₆	0,3	0,3±0,1	0,3	-

Затем экстракты премиксов были проанализированы методами МЛР и PLS. При этом было учтено, что все изученные премиксы содержали, помимо витаминов, минеральные и другие добавки, которые также могут поглощать в УФ области. Для учета их влияния были сняты спектры экстрактов минеральных премиксов, в состав которых витамины не входили, а по остальным компонентам составы минеральных и витаминно-минеральных премиксов совпадали. Затем из спектров витаминных премиксов вычитали спектры минеральных премиксов, получая таким образом «исправленный» спектр витаминного премикса, который и анализировали. Сравнение результатов анализа премикса методами МЛР и PLS показывает, что методом МЛР, как и в случае модельных смесей, не удастся определить витамин B₃. По остальным витаминам результаты, полученные метода-

ми МЛР и PLS, хорошо согласуются между собой и рецептурой премикса (табл.8)

Таблица 8

Результаты спектрофотометрического определения витаминов в премиксе (n=3, P=0,95)

Витамин	Содержание по рецептуре, мг/г	С найд., мг/г	
		МЛР	PLS
B ₂	0,8	0,83 ± 0,20	0,83 ± 0,1
B ₅	3,0	2,98 ± 0,52	3,05 ± 0,13
B ₆	0,3	0,31 ± 0,02	0,28 ± 0,01
B ₁	0,15	0,17 ± 0,13	0,14 ± 0,09
B ₃	1,0	0,33 ± 0,20	0,55 ± 0,08

Те же премиксы были проанализированы и по разработанной методике ВЭЖХ. Результаты анализа экстрактов премиксов, полученные с применением ВЭЖХ и СФ-анализа (вариант PLS), совпадают, различия средних значений для всех витаминов статистически не значимо. Для витамина B₆ методом СФ (PLS) удается достоверно повысить сходимость результатов, для остальных витаминов сходимость обеих методик одинакова (табл. 9).

Таблица 9

Результаты анализа премикса методами СФ (PLS) и ВЭЖХ (n=3, P=0,95)

Витамин	Содержание по рецептуре, мг/г	С найд., мг/г	
		СФ (PLS)	ВЭЖХ
B ₁	1,2	1,23 ± 0,13	0,91 ± 0,31
B ₂	4,0	4,11 ± 0,42	3,36 ± 0,68
B ₃	6,0	6,16 ± 0,63	6,14 ± 0,21
B ₅	24,0	21,35 ± 3,55	22,11 ± 2,85
B ₆	2,0	2,05 ± 0,21	1,97 ± 0,98
K ₃	2,0	2,05 ± 0,21	не опр

Таким образом, спектрофотометрический анализ премиксов на содержание водорастворимых витаминов группы В методом PLS не уступает по точности хроматографическому, при этом является более экономичным и экспрессным.

ВЫВОДЫ

1. Для повышения точности анализа многокомпонентных смесей витаминов по методу множественной линейной регрессии (МЛР) следует оптимизировать спектральные диапазоны, для которых ведется расчет концентраций. При ис-

пользовании широкого спектрального диапазона погрешности определения индивидуальных витаминов составляют 10-15% отн, а при расчете концентрации каждого витамина по специфичному для него узкому диапазону длин волн погрешности снижаются до 3-5% отн. Оптимизацию спектральных диапазонов целесообразно проводить путем компьютерного моделирование спектров смесей с учетом уровня случайных погрешностей.

2. Применение метода МЛР с оптимизацией спектральных диапазонов позволяет определять компоненты модельных смесей даже в том случае, когда содержания витаминов (по массе) различаются более чем в 10 раз. При этом участки, где наблюдаются отклонения от аддитивности, должны быть исключены из рассмотрения.
3. Метод проекции на латентные структуры (PLS) применим к анализу 4-6-компонентных смесей витаминов даже при небольших, но статистически значимых отклонениях от аддитивности. Для построения градуировочной модели достаточно 13 обучающих смесей. С помощью такой модели все витамины в шестикомпонентных смесях определяются методом PLS с погрешностью менее 2% отн.
4. Найден состав элюента и режим хроматографического разделения витаминных смесей, позволяющий количественно определять все компоненты смесей, содержащих 6-9 витаминов с погрешностью 3-5 % отн. Время разделения – порядка 20 минут.
5. Разработана и внедрена в практику методика экстракционно-хроматографического определения шести витаминов в серийно выпускаемых поливитаминных препаратах - премиксах на уровне 0,01-5%. Методика характеризуется хорошим разрешением хроматографических пиков. Единичный анализ занимает 30-40 минут. Коэффициент вариации порядка 5 % отн.
6. Разработаны методики экстракционно-спектрофотометрического определения 5-6 витаминов в премиксах на уровне 0,01-5%, основанные на расчете концентраций методами МЛР или PLS. Единичный анализ с применением заранее построенной модели занимает 10-15 минут. Коэффициент вариации порядка 2-

3 %. Полученные результаты хорошо согласуются с рецептурой премиксов, а также результатами экстракционно-хроматографического анализа.

7. Спектрофотометрическое определение витаминов по разработанным методикам может быть рекомендовано для массового анализа однотипных премиксов, в частности для экспрессного технологического контроля качества премиксов в процессе их производства. Хроматографическое определение может быть рекомендовано организациям-потребителям для разовых анализов премиксов, существенно различающихся по своему составу.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. *Власова, И.В.* Определение водорастворимых витаминов в премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / *И.В. Власова, Е.Н. Масякова, Л.А. Богданова, Н.Ю. Пермякова* // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2007. – Т. 73. – № 9. – С. 25–27.
2. *Богданова, Л.А.* Хроматографическое определение водорастворимых витаминов в премиксах / *Л.А. Богданова, Е.Н. Масякова, Н.Ю. Пермякова, И.В. Власова* // Вестник Омского университета. – 2007. – № 1. – С. 26–29.
3. *Масякова, Е.Н.* Определение водорастворимых витаминов группы В в неразделенных смесях / *Е.Н. Масякова, А.С. Шелпакова, А.В. Феллер, И.В. Власова* // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. тр. / Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Вып. 63. – Пятигорск, 2008. – С. 303–304.
4. *Власова, И.В.* Спектрофотометрический анализ смесей витаминов с применением метода множественной линейной регрессии / *И.В. Власова, А.С. Шелпакова, Е.Н. Масякова* // Аналитика и контроль. – 2009. – Т. 13. – № 2. – С. 86–90.
5. *Шелпакова, А.С.* Применение метода множественной линейной регрессии в спектрофотометрическом анализе смесей витаминов / *А.С. Шелпакова, Е.Н. Масякова* // Вестник Омского университета. – 2009. – № 2. – С. 172–177.
6. *Пермякова, Н.Ю.* Определение водорастворимых витаминов в премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / *Н.Ю. Пермякова, Е.Н. Масякова, А.А. Костенко* // Всероссийская конференция Менделеевские чтения: Всероссийская конф.: Тр. конф. – Тюмень, 2005. – С. 312–314.

7. *Власова, И.В.* Применение производной спектрофотометрии для анализа многокомпонентных смесей водорастворимых витаминов / И.В. Власова, Е.Н. Масякова, К.Н. Екимова // Актуальные проблемы современной науки: 1-й Международный форум: Тез. докл. – Самара, 2005. – С. 165–166.
8. *Богданова, Л.А.* Моделирование возможности одновременного определения витаминов в многокомпонентных смесях по методу Фирордта / Л.А. Богданова, Е.Н. Масякова, Н.Ю. Пермякова // VII всероссийская конференция молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям: Тез. докл. – Красноярск, 2006. – С. 39.
9. *Власова, И.В.* Хемометрический подход к анализу многокомпонентных смесей по УФ-спектрам поглощения / И.В. Власова, А.В. Шилова, Е.Н. Масякова // Аналитика России-2007: Всерос. конф. по аналит. химии: Тез. докл. – Краснодар, 2007. – С. 287.
10. *Масякова, Е.Н.* Компьютерное моделирование спектрофотометрического определения витаминов в 2-5-компонентных смесях по методу Фирордта / Е.Н. Масякова // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: Тез. докл. – М., 2007. – С.89.
11. *Масякова, Е.Н.* Моделирование и применение множественной регрессии в спектрофотометрическом анализе многокомпонентных смесей / Е.Н. Масякова, А.С. Шелпакова // VIII Всероссийская конференция молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям: Тез. докл. – Новосибирск, 2007. – С. 60–61.
12. *Масякова, Е.Н.* Применение регрессионных методов в спектрофотометрическом анализе многокомпонентных смесей / Е.Н. Масякова, А.С. Шелпакова // VIII Всероссийская конференция молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям: Тез. докл. – Новосибирск, 2007. – С. 61–62.
13. *Власова, И.В.* Application of method PLS in the spectrophotometric analysis for simultaneous definitions of all substances in 2-6 plural-component mixes / И.В. Власова, Е.Н. Масякова, А.С. Шелпакова // Современные методы анализа многомерных данных: Шестой междунар. симпозиум: Тез. докл. – Казань, 2008. – С. 36–37.
14. *Шелпакова, А.С.* Применение регрессионных методов в спектрофотометрическом анализе многокомпонентных смесей органических веществ / А.С. Шелпакова

- ва, А.Ю. Корягина, Е.Н. Масыкова // Химия под знаком Сигма: Всерос. науч. молодежная школа-конф.: Тез. докл. – Омск, 2008. – С. 249–251.
15. Власова, И.В. Спектрофотометрический анализ 3-6 компонентных смесей с применением метода множественной линейной регрессии / И.В. Власова, С.М. Добровольский, Е.Н. Масыкова, М.Н. Мызникова // Аналитика Сибири и Дальнего Востока: Всерос. конф.: Тез. докл. – 2008. – С. 236.

Диссертант и его научный руководитель выражают благодарность председателю Российского хемометрического общества, зам. председателя комиссии НСАХ по хемометрике доктору ф.-м. наук Померанцеву А.Л., секретарю комиссии НСАХ по хемометрике, доктору ф.-м. наук Родионовой О.Е., за ценные советы при постановке исследования, а также компании САМО (Норвегия) за предоставленную лицензионную версию программы The Unscrambler.