

УДК 543.062

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ А, D₃ И Е В СОСТАВЕ ПРЕМИКСОВ «МАУЭРВИТ» И «ГРАНДВИТАМ» МЕТОДОМ УЛЬТРАВЭЖХ

А.В. Баклыков¹, Г.А. Артемьев^{1,2}, С.А. Главатских^{1,2}, Д.С. Копчук^{1,3*}

Резюме. Разработана удобная методика анализа содержания витаминов А, D₃ и Е в составе премиксов (испытания проведены на примере премиксов «Мауэрвит» и «Грандвитам») методом ультраВЭЖХ. В методику были внесены необходимые изменения по сравнению с представленной ранее в ГОСТ Р 50928-96 ввиду наличия в составе премиксов компонентов, затрудняющих проведение анализа (в частности, твина-80). Разработанная методика опробована с точки зрения специфичности, правильности и прецизионности. Кроме этого, продемонстрирована возможность использования более простой с точки зрения процедуры методики для анализа витаминного экстракта, используемого в качестве сырья для производства премиксов.

Ключевые слова: ультраВЭЖХ, количественный анализ, витамины А, D₃ и Е.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF VITAMINS A, D₃ AND E IN PREMIXES «MAUERVIT» AND «GRANDVITAM» BY ULTRA HPLC

A.V. Baklykov¹, G.A. Artem'ev^{1,2}, S.A. Glavatskikh^{1,2}, D.S. Korchuk^{1,3*}

Abstract. A convenient method for analyzing the content of vitamins A, D₃ and E in premixes has been developed (the tests were carried out using the example of the premixes «Mauervit» and «randvitam») using ultra HPLC. The necessary changes of the procedure have been made in comparison with the ones presented previously in GOST R 50928-96 due to the presence in the premix components hampering analysis (in particular, Tween 80). The developed procedure has been tested in terms of specificity, accuracy and precision. In addition, the possibility of using a simpler procedure for the analysis of vitamins extract, used as raw material for premix production, has been demonstrated.

Keywords: ultra HPLC, quantitative analysis, vitamins A, D₃ and E.

1 – ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Пастовского УрО РАН, 620990, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, д. 22 / ул. Академическая, д. 20

2 – ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», 620014, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3

3 – ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

1 – I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 20, Akademicheskaya str. / 22, Kovalevskoy str., Ekaterinburg, 620990, Russia

2 – Ural State Medicinal University, 3, Repina str., Ekaterinburg, 620014, Russia

3 – Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, 19, Mira str., Ekaterinburg, 620002, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: dkorchuk@mail.ru

Тел.: 8 (343) 374 11 89

ВВЕДЕНИЕ

Использование различных ветеринарных препаратов при разведении сельскохозяйственных животных в современных реалиях является необходимым условием успешного выполнения этой задачи. В частности, с этой целью часто применяются препараты, содержащие различные витамины. Это необходимо с точки зрения повышения питательности комбикормов и улучшения биологического действия их на организм сельскохозяйственных животных [1]. Витамины являются незаменимыми элементами, необходимыми для роста, развития и жизнедеятельности животных, и их содержание в кормах строго регламентируется, так как для живого организма вреден как недостаток витаминов, так и их избыток [2–

4]. Следовательно, аналитический контроль содержания витаминов в подобных препаратах является важной и актуальной задачей. Однако к настоящему времени затруднительным является совместное определение нескольких витаминов, особенно при наличии значительного количества сопутствующих соединений в смеси. Используемые в настоящее время методы анализа (колориметрический, спектрофотометрический, ВЭЖХ) зачастую не позволяют выполнить эту задачу. В рамках данной работы предложено использовать с целью совместного определения витаминов А, D₃ и Е в составе премиксов «Грандвитам» и «Мауэрвит», выпускаемых технологической лабораторией ИОС УрО РАН, метод ультраВЭЖХ. Применение этого метода обычно позво-

ляет сократить расход используемых растворителей, а также время на проведение анализа при получении более точных и достоверных результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие коммерчески доступные реактивы:

- 1) витамин А (A2094,0010, Panreac, AppliChem, Vitamin A acetate, активность 1499 U/mg),
- 2) витамин D₃ (C9756, SIGMA, Cholecalciferol 98,2%, HPLC),
- 3) витамин Е (Т3376, SIGMA, DL-α-Tocopherol acetate 96,7%, HPLC),
- 4) калия гидроксид (484016, Sigma-Aldrich),
- 5) метанол (494291, Aldrich, HPLC grade),
- 6) изопропанол (ч.д.а., ООО «Вектон»),
- 7) гексан (ч.д.а., ООО «Вектон»),
- 8) гидрохинон (H9003, Sigma-Aldrich).

В работе использовали жидкостной хроматограф Waters Acquity UPLC с фотодиодным детектором с колонкой Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm, длиной 30 мм, диаметром 2,1 мм.

Для всех опробованных методик применяли следующие условия хроматографирования: термостатирование колонки при 25 °С, элюент – метанол (ВЭЖХ, 100 %), расход через колонку 0,3 см³/мин, ввод 1,0 мкл. Детектирование осуществлялось при помощи детектора светодиодной матрицы при длине волны 254 нм (для витамина D₃), 286 нм (для витамина Е), 328 нм (для витамина А). Время проведения анализа 4 мин.

Мерные колбы, пробирки, пипетки и посуду, используемую для приготовления растворов, промывали хромовой смесью, затем дистиллированной водой и выдерживали в течение 4 ч в сушильном шкафу при температуре 100–150 °С.

1. Методика определения витаминов А, D₃, Е в премиксах «Мауэрвит» и «Грандвитам», а также в витаминном экстракте для премикса с экстракцией изопропанолом

1.1. Приготовление исходного раствора смеси витаминов А, D₃, Е в изопропаноле

Для получения раствора смеси витаминов А, D₃, Е с номинальными концентрациями витаминов 1,0 мг/мл, 0,05 мг/мл и 1,2 мг/мл соответственно в мерную колбу со шлифом вместимостью 10 мл помещали навески витаминов (таблица 1), взвешивали на аналитических весах, добавляли 5 мл изопропанола, после растворения и термостатирования доводили до метки изопропанолом.

Действительное значение концентрации каждого витамина в исходном растворе рассчитывали по формуле (1):

$$C_{\text{исх}} = m \cdot A/V, \quad (1)$$

где m – масса навески, мг; A – содержание основного вещества, мг/мл; V – объем приготовленного раствора, мл.

Полученные концентрации витаминов и необходимые навески представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Действительные концентрации витаминов А, D₃, Е в растворе

Вещество	Исходная концентрация раствора, мг/г	Навеска, г	Действительная концентрация в полученном растворе, мг/мл
Витамин А, масляный раствор	37,11	0,2750	1,020
Витамин D ₃ , масляный раствор	0,53	1,0093	0,054
Витамин Е, чистый	999,99	0,0125	1,205

1.2. Приготовление градуировочных растворов смеси витаминов в изопропаноле

В мерные колбы вместимостью 10 мл вносили по 0,5, 1, 2 и 5 мл исходного раствора смеси витаминов А, D₃, Е в изопропаноле и доводили до метки изопропанолом.

Рассчитывали действительные концентрации градуировочных растворов по формуле (2) (таблица 2).

$$C_{\text{гр}} = \frac{C_{\text{исх}} \cdot V_{\text{исх}}}{V_{\text{гр}}}, \quad (2)$$

где $C_{\text{исх}}$ – концентрация исходного раствора, мг/мл; $V_{\text{исх}}$ – объем исходного раствора, мл; $V_{\text{гр}}$ – объем градуировочного раствора, мл.

Таблица 2.

Действительные концентрации витаминов А, D₃, Е в градуировочных растворах

Наименование раствора	Концентрация витамина А, мг/мл	Концентрация витамина D ₃ , мг/мл	Концентрация витамина Е, мг/мл
Раствор I	0,051	0,003	0,060
Раствор II	0,102	0,005	0,121
Раствор III	0,204	0,011	0,241
Раствор IV	0,510	0,027	0,603
Раствор V	1,020	0,054	1,205

Каждый полученный раствор хроматографировали трижды в соответствии с вышеописанными условиями.

1.3. Проведение экстракции изопропанолом витаминов А, D₃, Е из премиксов

В мерные колбы вместимостью 10 мл вносили по 0,5, 1, 2 и 5 мл соответствующего премикса и доводили до метки изопропанолом. Выдерживали 10 мин, после чего хроматографировали дважды в соответствии с вышеописанными условиями.

1.4. Проведение экстракции изопропанолом витаминов А, D₃, Е из витаминного экстракта для премиксов

В мерные колбы вместимостью 10 мл вносили по 0,1 и 0,5 мл экстракта премиксов и доводили до метки изопропанолом. Выдерживали 10 мин, после чего хроматографировали дважды в соответствии с вышеописанными условиями.

2. Методика определения витаминов А, D₃, Е в премиксе «Мауэрвит» (экстракция гексаном)

2.1. Приготовление исходного раствора смеси витаминов А, D₃, Е в изопропаноле

Для получения исходного раствора витаминов А, D₃, Е в изопропаноле с номинальными концентрациями витаминов 1,0 мг/мл, 0,1 мг/мл и 1,1 мг/мл соответственно в мерную колбу со шлифом вместимостью 10 мл помещали навески витаминов (таблица 3), взвешивали на аналитических весах, добавляли 5 мл изопропанола, после растворения и термостатирования доводили до метки изопропанолом.

Действительное значение концентрации каждого витамина в исходном растворе рассчитывали по формуле (1) (таблица 3).

Таблица 3.

Действительные концентрации витаминов А, D₃, Е в растворе

Вещество	Исходная концентрация раствора, мг/г	Навеска, г	Действительная концентрация в полученном растворе, мг/мл
Витамин А, масляный раствор	37,11	0,2750	1,020
Витамин D ₃ , масляный раствор	0,53	1,0093	0,054
Витамин Е, чистый	999,99	0,0125	1,205

2.2. Методика пробоподготовки раствора смеси витаминов А, D₃, Е

В круглодонную колбу вместимостью 100 см³, снабженную обратным холодильником, вносили навеску гидрохинона (0,03 г), добавляли 2 см³ метанола, 2 см³ исходного раствора витаминов А, D₃, Е в изопропаноле с номинальными концентрациями витаминов 1,0 мг/мл, 0,1 мг/мл и 1,1 мг/мл соответственно и 25 см³ раствора для гидролиза (10 %-ный водно-спиртовой раствор гидроокиси калия: 5,0 г КОН в 2,5 см³ дистиллированной воды и 22,5 см³ этилового спирта). Полученный раствор нагревали на водяной бане при температуре 83±2 °С в течение 30 мин. Охлаждали содержимое колбы до комнатной температуры под струей холодной воды. Затем фильтровали содержимое колбы через бумажный обеззоленный фильтр «белая лента» с вакуумным насосом в колбу Бунзена, далее проводили экстракцию гексаном: к фильтрату добавляли 15 см³ дистиллированной воды и 10 см³ гексана, интенсивно перемешивали и переливали содержимое в делительную воронку на 250 см³, промывали колбу 5 см³ гексана в делительную воронку. После расслаивания нижний слой (водно-спиртовой) сливали обратно в колбу, а гексановый слой оставляли в делительной воронке. Повторяли экстракцию гексаном трижды. Затем промывали содержимое делительной воронки дистиллированной водой порциями по 20 см³ до нейтральной реакции среды по индикаторной бумаге.

Промытый раствор помещали в сухую перегонную колбу объемом 250 см³. Делительную воронку и фильтрующий материал промывали несколько раз гексаном порциями по 5 см³, затем объединяли все полученные гексановые вытяжки и отгоняли гексан на водяной бане при температуре 85±2 °С.

Сухой остаток растворяли в 5 см³ метанола, переносили в мерную колбу вместимостью 10 см³, затем туда же добавляли метанол, которым омывали круглодонную колбу вместимостью 250 см³ и воронку до объема в 10 см³.

2.3. Приготовление градуировочных растворов смеси витаминов после пробоподготовки

В мерные колбы вместимостью 10 мл вносили по 0,5, 1, 2 и 5 мл раствора смеси витаминов А, D₃, Е, обработанного по вышеописанной методике, и доводили до метки метанолом.

Рассчитывали действительные концентрации градуировочных растворов по формуле (2) (таблица 4).

Каждый полученный раствор хроматографировали трижды в соответствии с условиями, представленными в п. 1.2.

2.4. Проведение пробоподготовки премикса «Мауэрвит»

Пробоподготовку проводили по методике, описанной в п. 1.2, но вместо 2 см³ исходного раствора ви-

таминов А, D₃, Е в изопропанол добавляли 2 см³ соответствующего премикса.

Таблица 4.

Действительные концентрации витаминов А, D₃, Е в градуировочных растворах

Наименование раствора	Концентрация витамина А, мг/мл	Концентрация витамина D ₃ , мг/мл	Концентрация витамина Е, мг/мл
Раствор I	0,049	0,005	0,060
Раствор II	0,098	0,011	0,121
Раствор III	0,196	0,021	0,241
Раствор IV	0,490	0,053	0,603
Раствор V	0,980	0,107	1,205

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время существует множество работ, в которых описывается определение витаминов А, D₃, Е в различных объектах. С этой целью применяются колориметрические, спектрофотометрические и ВЭЖХ-методы анализа. Так, колориметрические методы определения витамина А в масляных растворах основаны на образовании цветных комплексов в присутствии треххлористой сурьмы [5]. Проблема данной методики заключается в том, что количественно можно определить витамин А только в простых растворах, любые сопутствующие вещества будут затруднять как проведение реакции, так и выполнение анализа. Определение витамина D₃ колориметрическим методом возможно после проведения реакции с двуххлористым оловом [6], при которой образуется соединение, окрашенное в желто-розовый цвет, с максимумом поглощения света в области 500 нм. Количественное определение витамина D₃ в пищевых продуктах представляет собой чрезвычайно сложную задачу ввиду его низкого содержания, отсутствия чувствительных специфических реакций на него и трудностей отделения от сопутствующих веществ. В связи с этим для многих продуктов с низким содержанием витамина D₃ до настоящего времени единственно приемлемым является метод ВЭЖХ [7].

Количественное определение витамина Е возможно произвести спектрофотометрически, колориметрически и методом ВЭЖХ. Спектрофотометрия в видимой области основана на способности токоферолов окисляться с образованием окрашенных продуктов [8], химическая структура и окраска которых разнообразны и зависят от характера окислителя. Наиболее известным из колориметрических методов анализа витамина Е, нашедшим широкое применение в аналитической практике, является метод Эммери – Энгеля [9]. Используя в качестве индикатора 2,2'-бипиридин или 1,10-фенантролин, фотометрически из-

меряют интенсивность окраски образовавшегося красного комплекса иона двухвалентного железа и соответствующего лиганда.

Таким образом, колориметрическое определение всех трех витаминов в одном растворе является трудоемкой задачей, требующей проведения специфических реакций с каждым из витаминов. Также известно, что совместное определение витаминов А, D₃, Е колориметрическим методом дает лишь удовлетворительные результаты [7].

Методы определения витаминов А, D₃, Е с помощью ВЭЖХ, описанные в литературе, можно разделить на 2 группы, а именно: используется метод растворения исследуемого вещества в спиртах (метанол [7, 10] или изопропанол [11]) с прямым вводом пробы в хроматограф, а также метод экстракции витаминов А, D₃, Е из образца гексаном с последующим гидролизом и анализом пробы [12–14]. Первая группа методов используется для простых растворов, не содержащих в своем составе ничего, кроме самих витаминов, жиров и растворителей. При попытке анализа проб, содержащих сложные матрицы, количественное определение витаминов данными методами невозможно [10]. Основной причиной этого является наличие в образце веществ, имеющих схожие с витаминами спектры поглощения. Вторая группа методов позволяет проводить количественное определение витаминов А, D₃, Е в растворах со сложными матрицами, но все найденные статьи описывают проведение анализа с использованием нормально-фазовой ВЭЖХ. При этом следует отметить, что использование метода ультраВЭЖХ для количественного анализа витаминов А, D₃ и Е к настоящему времени в литературе не описано, несмотря на определенные перспективы использования данного метода, особенно при проведении экспрессного разделения [15].

Технологической группой ИОС УрО РАН к настоящему времени освоено опытно-промышленное производство премиксов «Мауэрвит» и «Грандвитам», применяющихся в качестве кормовой добавки для крупного рогатого скота. Разумеется, на конечной стадии производства необходим контроль качества готовой продукции. Также необходим входной контроль содержания витаминов А, D₃, Е в экстракте для премиксов. Разрабатываемые и применяемые для контроля производства методики должны быть просты в исполнении, не требовать сложной пробоподготовки, использовать доступные реагенты и аппаратное оформление.

В качестве основы методики в рамках данной работы были взяты методики определения витаминов А, D₃, Е согласно ГОСТ Р 50928-96 [14], в которые необходимо было внести изменения с целью проведения количественного анализа на ультраВЭЖХ Waters Acquity UPLC с использованием хроматографической колонки Waters Acquity UPLC BEH C18 и детектора Waters Acquity UPLC PDA.

Основной проблемой при проведении данного анализа является экстракция жирорастворимых витаминов А, D₃, Е из премиксов, так как методики экстракции, приведенные в ГОСТ Р 50928-96, были разработаны для количественного определения витаминов А, D₃, Е в сухих премиксах. В то же время премиксы «Мауэрвит» и «Грандвитам» являются жидкими, а их матрица содержит различные компоненты, в том числе эмульгаторы, заметно усложняющие проведение анализа.

Для разработки методики количественного определения витаминов А, D₃, Е в исследуемых растворах первоначально была проведена оценка хроматографических параметров (отклик детектора, время удерживания, предел детектирования) данных витаминов, при этом использовались градуировочные растворы витаминов А, D₃, Е в изопропанол. При регистрации хроматограмм в случае элюирования 100% метанолом на колонке Waters Acquity UPLC BEH C18 был установлен следующий порядок выхода витаминов: А, D₃ и Е (рисунок 1). Время выхода последнего витамина Е составляет 2,98 мин, что позволяет ограничить время анализа 4 мин. Поскольку в ультраВЭЖХ используется колонка с меньшим внутренним объемом, чем в классической ВЭЖХ, объем вводимой пробы был уменьшен с 10 до 1 мкл. С целью детектирования были использованы длины волн, соответствующие максимуму поглощения каждого витамина.

Для построения градуировочных графиков вводили 3 раза по 1,0 мкл каждого градуировочного раствора (п. 1.2 раздела «Материалы и методы»), в результате получали зависимости площади пика от концентрации витаминов А, D₃, Е в растворе. Градуировочные графики строили по методу наименьших квадратов. Уравнение прямой линии имеет вид:

$$y = \alpha \cdot x + b,$$

где x – концентрация исследуемого соединения в растворе, мг/мл; y – площадь пика, мВ·с; α – $\text{tg } \alpha$ (α – угол наклона прямой линии).

Коэффициенты α и b рассчитываются по формулам 3 и 4.

$$\alpha = (n\sum x_i y_i - \sum x_i y_i) / (n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2) \quad (3)$$

$$b = (\sum y_i - \alpha \sum x_i) / n \quad (4)$$

Градуировочный график для витамина А линейен в диапазоне концентраций 0,05–0,2 мг/мл, для витамина D – 0,003–0,055 мг/мл, для витамина Е – 0,06–1,2 мг/мл. Уравнения градуировочных графиков представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Уравнения градуировочных графиков и время удерживания витаминов А, D₃, Е

Название	Время удерживания, мин	Уравнение
Витамин А	1,257	$y = 127199 \cdot x - 3155$
Витамин D ₃	2,056	$y = 219259 \cdot x - 5274$
Витамин Е	2,915	$y = 232976 \cdot x - 3180$

Градуировочные графики для витаминов А, D₃, Е представлены на рисунках 2–4.

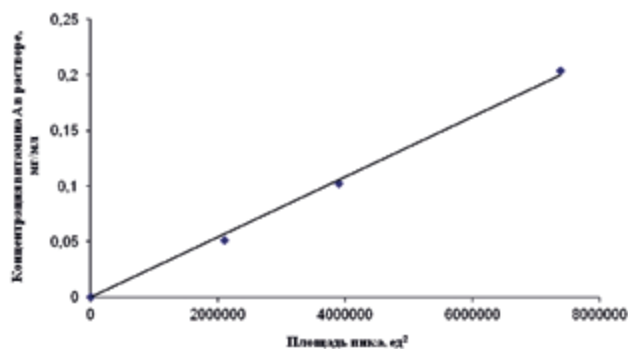


Рисунок 2. Градуировочный график по растворам витамина А в изопропанол

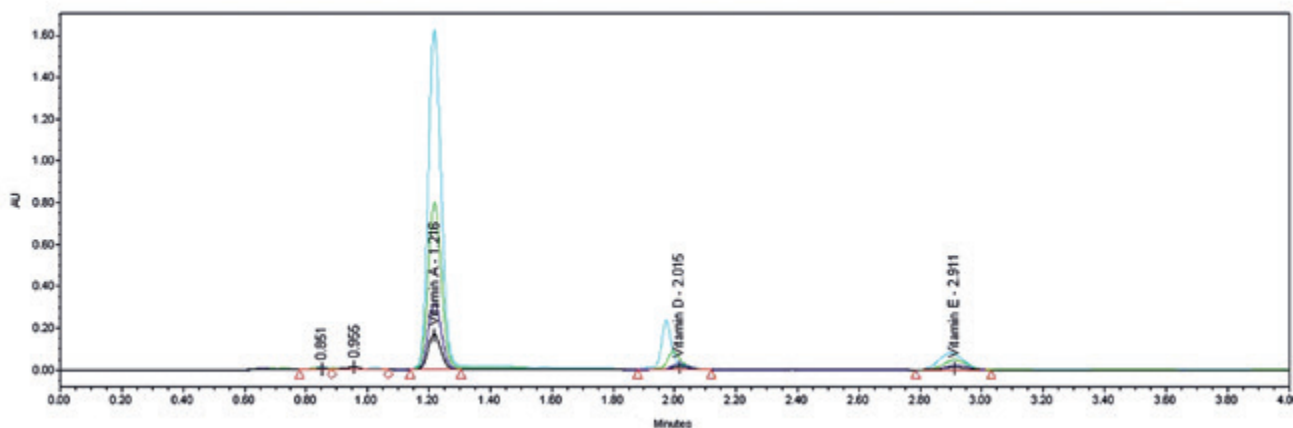


Рисунок 1. Хроматограммы градуировочных растворов смеси витаминов А, D₃, Е

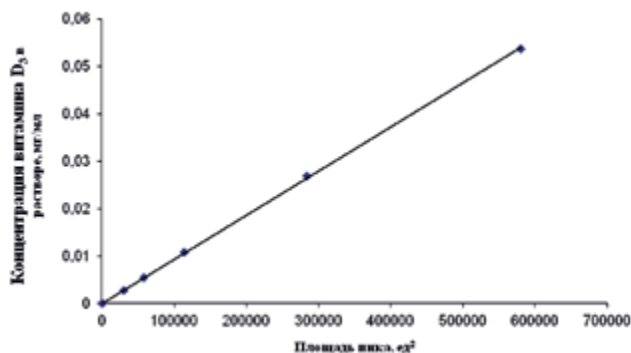


Рисунок 3. Градуировочный график по растворам витамина D₃ в изопропанол

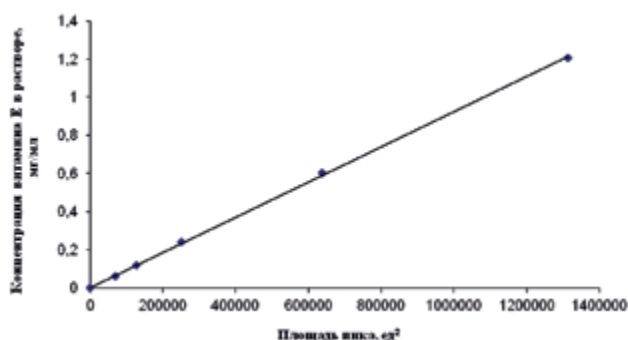


Рисунок 4. Градуировочный график по растворам витамина E в изопропанол

Попытка использования этой же методики для анализа премиксов успехом не увенчалась, а именно: было найдено, что в ходе анализа не происходит разделения пиков веществ, содержащихся в премиксе. На рисунке 5 представлена хроматограмма премикса «Мауэрвит», обработанного изопропанолом.

При анализе витаминного экстракта для премиксов, обработанного по методике, описанной в п. 1.4 раздела «Материалы и методы», на хроматограмме регистрируются три четко разделяющихся пика, времена удерживания которых соответствуют временам удерживания витаминов A, D₃ и E (рисунок 6). Из этого следует, что данная методика является пригодной для определения витаминов A, D₃, E в составе вита-

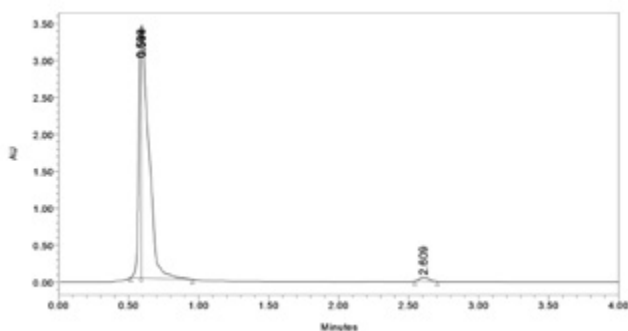


Рисунок 5. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», обработанного изопропанолом

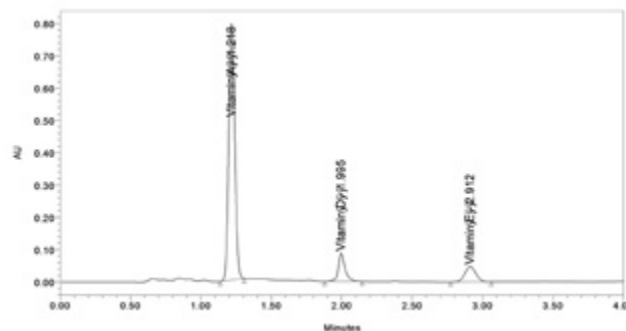


Рисунок 6. Хроматограмма витаминного экстракта для премикса «Мауэрвит», обработанного изопропанолом

минного экстракта, который используется для производства премиксов «Мауэрвит» и «Грандвита», то есть фактически может применяться с целью входного контроля сырья.

Поскольку методика экстракции витаминов A, D₃, E изопропанолом не дала удовлетворительных результатов, то на последующем этапе работы была опробована методика экстракции витаминов A, D₃, E гексаном с проведением предварительной реакции гидролиза, которая приведена в ГОСТ Р 50928-96. Данную методику необходимо было оптимизировать для проведения количественного анализа витаминов в премиксах «Мауэрвит» и «Грандвита» с использованием метода ультраВЭЖХ. Для этого нами был приготовлен и проанализирован исходный раствор витаминов A, D₃, E в изопропанол, приготовленный по методике, описанной в п. 2.1 раздела «Материалы и методы», и определены времена удерживания витаминов (представлены в таблице 6).

Таблица 6.

Уравнения градуировочных графиков и время удерживания витаминов A, D₃, E в растворе после пробоподготовки

Название	Время удерживания, мин	Уравнение
Витамин A	0,945	$y = 127199 \cdot x - 3155$
Витамин D ₃	1,916	$y = 219259 \cdot x - 5274$
Витамин E	2,235	$y = 232976 \cdot x - 3180$

На рисунке 7 представлена полученная хроматограмма исходных растворов витаминов A, D₃, E в изопропанол, прошедших пробоподготовку.

Для дальнейшего количественного определения содержания витаминов A, D₃, E в премиксах были изучены градуировочные зависимости для данных витаминов. Для этого использовали градуировочные растворы, приготовленные по методике п. 2.3 раздела «Материалы и методы», вводилось 3 раза по 1 мкл.

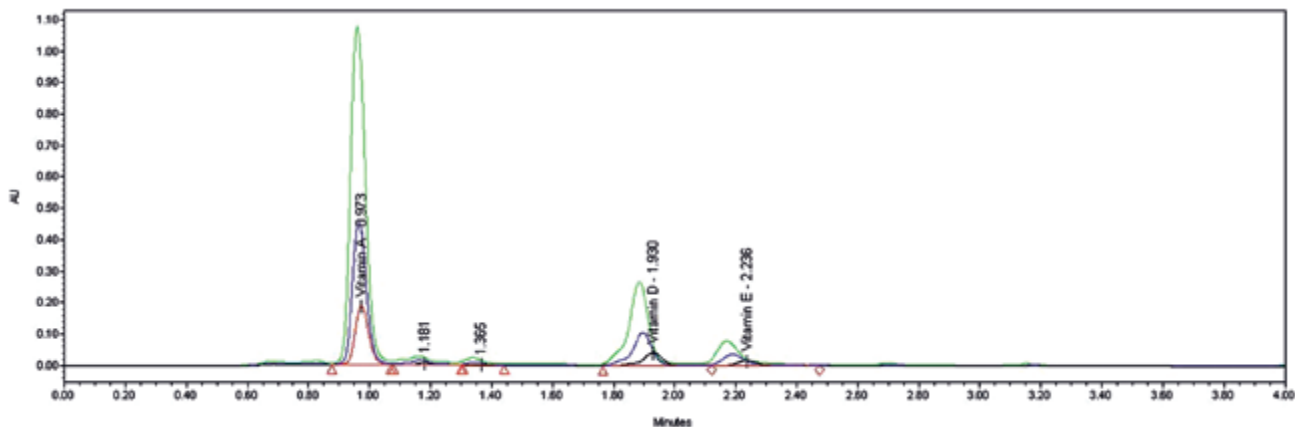


Рисунок 7. Хроматограмма исходных растворов витаминов А, D₃, Е, прошедших пробоподготовку

По полученным данным построили градуировочные графики (рисунки 8–10, уравнения представлены в таблице 6). Градуировочный график для витамина А линейен в диапазоне концентраций 0,05–0,2 мг/мл, для витамина D – 0,006–0,120 мг/мл, для витамина Е – 0,06–1,2 мг/мл.

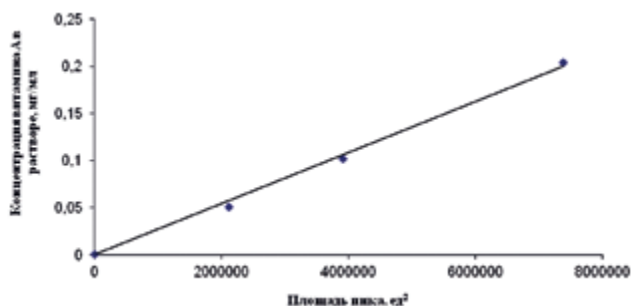


Рисунок 8. Градуировочный график по растворам витамина А в изопропанолe после пробоподготовки

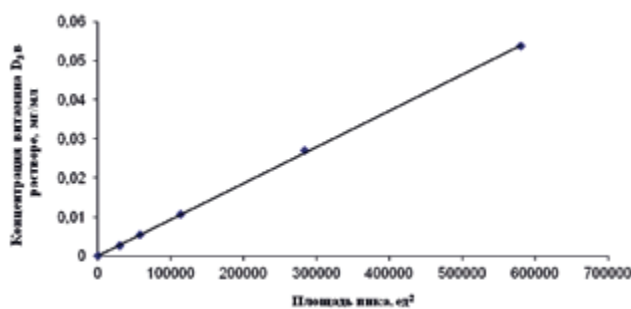


Рисунок 9. Градуировочный график по растворам витамина D₃ в изопропанолe после пробоподготовки

Таким образом, проведение пробоподготовки по данной методике не вносит каких-либо существенных изменений в линейный характер данных зависимостей, и данная методика может быть использована для проведения анализа витаминов А, D₃, Е в составе премиксов.

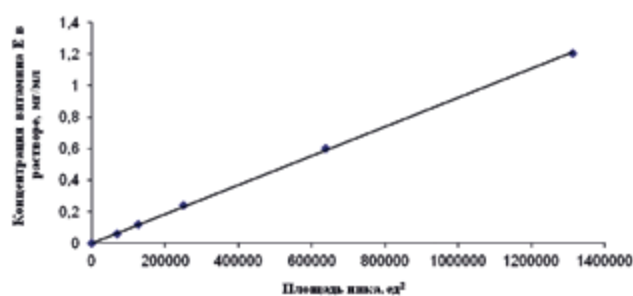


Рисунок 10. Градуировочный график по растворам витамина Е в изопропанолe после пробоподготовки

При проведении анализа премикса «Мауэрвит», приготовленного по методике, описанной в ГОСТ Р 50928-96, была получена хроматограмма, представленная на рисунке 11. Из полученной хроматограммы видно, что не происходит разделения пиков веществ, содержащихся в премиксе, и использовать данную методику без внесения существенных изменений для определения витаминов А, D₃, Е в премиксе не представляется возможным.

Нами был проанализирован состав премиксов с точки зрения выявления компонентов, способных затруднять проведение анализа данным методом, а

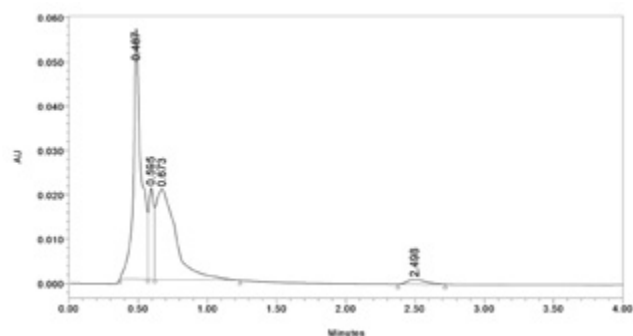
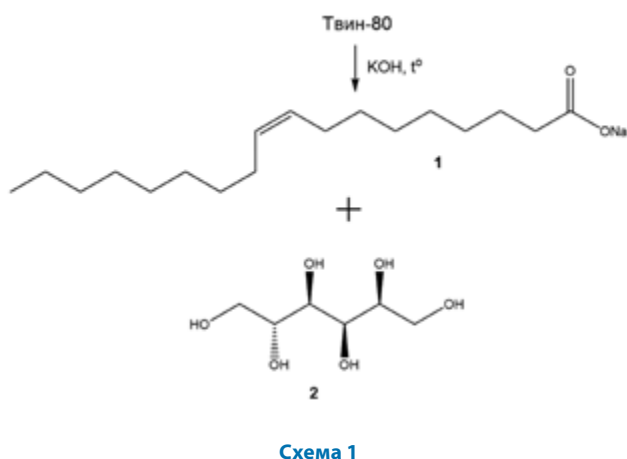


Рисунок 11. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», прошедшего пробоподготовку по ГОСТ Р 50928-96

именно: в составе анализируемых премиксов присутствуют такие компоненты, как витамины В₁, В₂, В₆, В₁₂, К₃, А, D₃, Е, никотинамид, кальция пантотонат, метионин, L-треонин, L-лизин, L-триптофан, аскорбиновая кислота, твин-80, холин хлорид, монопропиленгликоль и бензоат натрия.

Очевидно, что проведение экстракции гексаном гарантирует отделение от всех водорастворимых сопутствующих соединений. Однако в составе премиксов присутствует твин-80, который представляет собой сложный эфир олеиновой кислоты **1** и сорбитола **2**. Очевидно, что данное соединение в щелочных условиях также подвергается гидролизу (реакция представлена на схеме 1). Вероятно, наблюдаемое отсутствие хроматографической селективности могло происходить по причине недостаточного для гидролиза всех компонентов премикса количества щелочи.



Экспериментально было установлено, что необходимая навеска щелочи для проведения реакции гидролиза составляет 5,0 г. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», прошедшего пробоподготовку по ГОСТ Р 50928-96 с использованием данной навески щелочи, представлена на рисунке 12. На данной хроматограмме присутствуют пики веществ, затрудняющих дальнейшее количественное определение витаминов А, D₃, Е в премиксе «Мауэрвит».

Кроме этого, при проведении пробоподготовки было установлено, что после проведения реакции гидролиза на дне колбы образуется осадок, который представляет собой смесь солей жирных кислот, входящих в состав премикса. Было решено отфильтровать данный осадок и провести анализ фильтрата. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», прошедшего пробоподготовку и отфильтрованного после реакции гидролиза, представлена на рисунке 13.

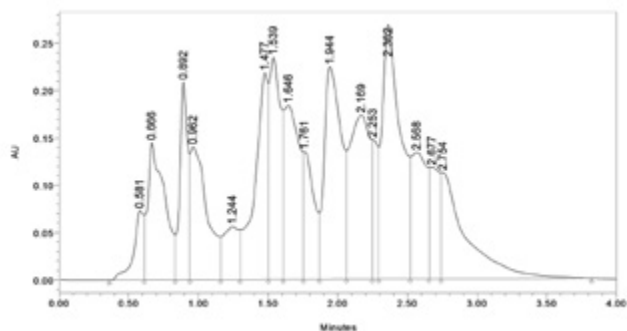


Рисунок 12. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», прошедшего пробоподготовку по ГОСТ Р 50928-96 с использованием большей навески щелочи

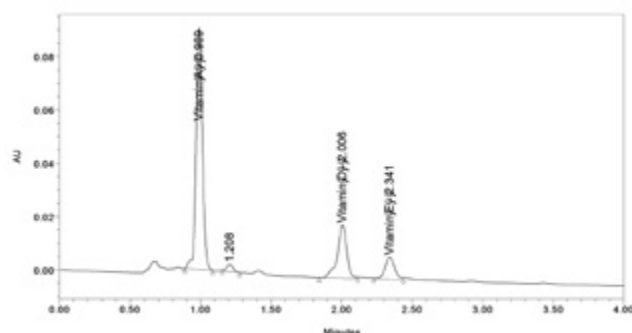


Рисунок 13. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», прошедшего пробоподготовку и отфильтрованного после реакции гидролиза

На хроматограмме регистрируются три пика (рисунок 13), времена удерживания которых соответствуют временам удерживания витаминов А, D₃ и Е. Также на данной хроматограмме отсутствуют посторонние пики, затрудняющие проведение количественного анализа при проведении пробоподготовки без фильтрации. Для того чтобы проверить истинность полученных результатов, были проанализированы экстракт витаминов А, D₃, Е для премиксов и сами премиксы, при этом была обнаружена высокая сходимость и воспроизводимость результатов, отклонение составляет не более 1%.

Для проверки пригодности вновь разработанная методика была протестирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность.

Для оценки специфичности методики нами был взят полуфабрикат премикса «Мауэрвит», не содержащий витаминов А, D₃, Е, и обработан по методике, описанной в п. 2.4 раздела «Материалы и методы». На рисунке 14 представлена хроматограмма данного образца. На данной хроматограмме не регистрируются пики с временами удерживания, соответствующими витамину А, D₃, Е, что свидетельствует о высокой специфичности разработанной методики.

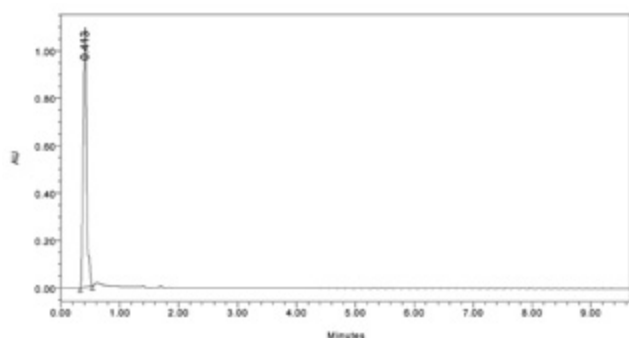


Рисунок 14. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», не содержащего витаминов А, D₃, Е, прошедшего пробоподготовку согласно п. 2.4 экспериментальной части

Для оценки правильности и прецизионности была выполнена статистическая обработка результатов количественного определения витаминов А, D₃, Е по разработанной методике и определены ее основные метрологические характеристики [16]. Данные статистической обработки результатов количественного определения витаминов А, D₃, Е представлены в таблице 7.

Таблица 7.

Данные статистической обработки результатов количественного определения витаминов А, D₃, Е по разработанной методике

Метрологические характеристики	Витамин А	Витамин Е	Витамин D ₃
среднее значение выборки $\bar{x}_{ср}$, мг/мл	0,195982	0,601716	0,053211
стандартное отклонение среднего результата S_x , мг/мл	0,000230	0,003701	0,000228
значение доверительного интервала среднего результата определения Δx , мг/мл	0,000638	0,010274	0,000633
относительная ошибка среднего результата определения ϵ , %	0,32	1,71	1,19
значение критерия Стьюдента t	2,776	2,776	2,776

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами предложена удобная методика анализа содержания витаминов А, D₃ и Е в составе премиксов (методика испытана на примере премиксов «Мауэрвит» и «Грандвитам») методом ультраВЭЖХ. При этом в методику были внесены необходимые

изменения относительно представленной ранее в ГОСТ Р 50928-96, учитывающие наличие в составе премиксов компонентов, затрудняющих проведение анализа (например, твин-80). Разработанная методика опробована с точки зрения специфичности, правильности и прецизионности, при этом показана ее применимость для анализа вышеуказанных витаминов в составе премикса. Кроме этого, продемонстрирована возможность использования более простой с точки зрения процедуры методики для анализа витаминного экстракта, используемого в качестве сырья для производства премиксов.

ЛИТЕРАТУРА

1. М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов. Общая технология микробиологических производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. 264 с.
2. Е.Ф. Иваненко. Биохимия витаминов. – Киев: Вища школа, 1970. 212 с.
3. Т.С. Морозкина, А.Г. Мойсеенок. Витамины: Краткое руководство для врачей и студентов мед., фармацевт. и биол. специальностей. – Минск: Асар, 2002. 114 с.
4. G.F. Combs, Jr. The Vitamins. Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Third Edition. – Burnugton: Elsevier Academic Press, 2008. 603 p.
5. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю.М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1979. 551 с.
6. А.И. Лутцева, Л.Г. Маслов, В.И. Середенко. Методы контроля и стандартизации лекарственных препаратов, содержащих жирорастворимые витамины (обзор) // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35. № 10. С. 41–45.
7. European Pharmacopoeia: Supplement. – Strasbourg: Council of Europe, 2008. 3905 p.
8. Е.В. Михеева, Л.С. Анисимова. Физико-химические методы определения витамина Е в различных объектах (обзор) // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2005. Т. 71. № 2. С. 3–9.
9. Е.В. Михеева, Л.С. Анисимова, Н.П. Пикула. Содержание витамина Е в поливитаминных препаратах // Фармация. 2004. № 5. С. 16–17.
10. Методика М 04-44-2006. Определение витаминов А, D и Е в премиксах и витаминных концентратах.
11. A.P. De Lechner. Simultaneous detection of retinol and α -tocopherol in human serum by high performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 1979. № 162. P. 408–413.
12. F.J. Ruperez. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices // J. Chromatogr. A. 2001. № 935. P. 45–69.
13. P. Salo-Väänänen, V. Ollilainen, P. Mattilab. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction // Food Chemistry. 2000. V. 71. № 4. P. 535–543.
14. ГОСТ Р 50928-96. Премиксы. Методы определения витаминов А, D, Е.
15. Я. Яшин, А. Веденин, А. Яшин. ВЭЖХ и ультраВЭЖХ: состояние и перспективы // Аналитика. 2015. Вып. 2. С. 70–84.
16. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность).