

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

Институт химии и инженерной экологии

(наименование института полностью)

Кафедра «Химия, химические процессы и технологии»

(наименование кафедры)

04.03.01 «Химия»

(код и наименование направления подготовки, специальности)

«Медицинская и фармацевтическая химия»

(наименование(профиль)/специализации)

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему: Оценка возможностей гидрофильной жидкостной хроматографии при определении витаминов группы В в лекарственных препаратах и продуктах питания

Студент

А.В. Семакова

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

О.Б. Григорьева

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Консультанты

Н.В. Ященко

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Допустить к защите

Заведующий кафедрой д.х.н., профессор Г.И. Остапенко

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

(личная подпись)

« » 2017 г.

Тольятти 2017

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ТОЛЬЯТТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ
(институт)

Химия, химические процессы и технологии
(кафедра)

УТВЕРЖДАЮ: _____
(подпись)

Зав. Кафедрой Остапенко Г.И.
« » _____ 2017 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение бакалаврской работы

Студенту Семаковой Алине Владиславовне

1. Тема квалификационной работы

Оценка возможностей гидрофильной жидкостной хроматографии при определении витаминов группы В в лекарственных препаратах и продуктах питания

2. Срок сдачи студентом готовой работы: 29 июня 2017 года

3. Исходные данные к работе литературные источники, витамины группы В, ЖХ Agilent 1220, пакет программ ChemBioDrawUltra 12.0, программное обеспечение PassOnline.

4. Содержание выпускной квалификационной работы (перечень подлежащих разработке вопросов, разделов)

4.1 Подготовить литературный обзор с оценкой возможностей различных вариантов ВЭЖХ в анализе продуктов, содержащих витамины В.

4.2. Подобрать подходящую методику и хроматографическую систему для определения витаминов (В₁, В₆, В₁₂).

4.3. Построить градуировочную зависимость для проведения количественного анализа методом абсолютной градуировки и определить содержание витаминов (В₁, В₆, В₁₂) в некоторых продуктах питания.

4.4.Подготовить аннотацию на английском языке (консультант по разделу к.ф.н. Н.В.Яценко)

5. Ориентировочный перечень графического (чертежи) и проиллюстрированного материала: структурные формулы исследованных витаминов, градуировочная зависимость площадей от концентрации, хроматограммы, презентация.

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы 12 октября, 2016 года

Руководитель _____
(подпись, дата)

Задание принял к исполнению

(подпись, дата)

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
 УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
 «ТОЛЬЯТТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
 ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ
 КАФЕДРА «ХИМИЯ, ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ И ТЕХНОЛОГИИ»

УТВЕРЖДАЮ: _____
 (подпись)

Зав. Кафедрой Остапенко Г.И.
 «___» _____ 2017 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН

бакалаврской работы

Студента: Семаковой Алины Владиславовны

по теме: Оценка возможностей гидрофильной жидкостной
 хроматографии при определении витаминов группы В в лекарственных
 препаратах и продуктах питания.

Наименование раздела работы	Плановый срок выполнения раздела	Фактический срок выполнения раздела	Отметка о выполнении	Подпись руководи теля
Подбор литературных источников и написание раздела «Литературный обзор»	01.04.2017 г.			
Выполнение экспериментальной части работы	12.10.2017 г.			
Написание раздела «Экспериментальная часть»	04.05.2017 г.			
Написание остальных разделов	14.05.2017 г.			
Верстка работы, проверка научным руководителем	20.05.2017 г.			
Проверка ВКР в системе «Антиплагиат.ВУЗ»	7.06.2017 г. 16.06.2017 г.			
Верстка и переплетение пояснительной записки	Первая неделя июня 2016 г.			
Оформление демонстрационного материала и устного доклада	За пять дней до защиты ВКР			

Руководитель выпускной
 квалификационной работы

 (подпись)

О.Б. Григорьева

(И.О. Фамилия)

А.В.Семакова

Задание принял к исполнению

 (подпись)

(И.О. Фамилия)

АННОТАЦИЯ

Данная выпускная бакалаврская работа изложена на 50 страницах, содержит 4 таблицы, 7 схем и 14 рисунков. Список литературы представлен 56 источниками.

Целью выпускной работы является оценка возможностей гидрофильной жидкостной хроматографии в анализе продуктов питания, содержащих витамины группы В, и количественное определение В₁, В₆, В₁₂ в образцах.

Объектами исследования в настоящей работе являются: стандарты витаминов В₁, В₆ и В₁₂, а также некоторые фармацевтические препараты и продукты питания, в которых контролировалось содержание витаминов группы В.

В литературном обзоре рассмотрены структуры и биологическая роль витаминов группы В, а так же рассмотрены методы анализов и фармацевтического контроля. Особое внимание уделено хроматографическим методам исследования, в частности гидрофильной ВЭЖХ.

В экспериментальной части приводятся объекты и методики проводимого хроматографического исследования.

В обсуждении результатов анализируются полученные хроматографические данные. Подобраны оптимальные условия для проведения анализа и определения витаминов В₁, В₆, В₁₂ в растворах. При помощи метода абсолютной калибровки были построены градуировочные кривые для каждого рассматриваемого витамина и найдено его количественное содержание в продуктах питания.

ABSTRACT

This diploma paper deals is devoted to the possibilities of hydrophilic chromatography in the determination of water-soluble vitamins of group B.

The aim of this work is to give some information about the method of determining the hydrophilic regime of vitamin B from food and pharmaceutical medicines.

The object of the graduation work is assessment of the possibilities of hydrophilic liquid chromatography.

The subject of the graduation work is pharmaceutical products, including infant nutrition and food containing vitamins B.

We start with the statement of the problem and then logically pass over to its possible solutions. The first part of the work is devoted to the review of the references including foreign sources. We consider the basics of the theory of hydrophilic chromatography, methods for determining vitamins in samples and the importance of B vitamins for the human body.

In the experimental part, the conditions of the chromatographic experiment and the procedure for sample preparation for analysis are given. Under the conditions of hydrophilic regime, the determination of group B vitamins in dairy products for baby food, juices and breast milk has been carried out.

The results of this work show the possibility of hydrophilic regime without gradient elution and temperature control.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ	9
ВВЕДЕНИЕ.....	10
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	Ошибка! Закладка не определена.
1.1 Строение и биологическая роль витаминов группы В.....	12
1.1.1 Витамин В ₁	12
1.1.2 Витамин В ₆	14
1.1.3 Витамин В ₁₂	18
1.2Методы анализа и фармацевтического контроля витаминов группы В.	20
1.2.1 Исследование образцов, содержащих витамины В.	20
1.2.1.1 Анализ продуктов питания, содержащих витамины В.....	20
1.2.1.2 Анализ фармацевтических препаратов, содержащих витамины В.	23
1.2.1.3 Анализ биологических материалов, содержащих витамины В.	24
1.3 Спектрофотометрические методы	25
1.4 Хроматографические методы.....	26
1.5 Гидрофильная хроматография	30
1.5.1 Основные методы.....	30
1.5.2 Гидрофильная ВЭЖХ в анализе витаминов.....	31
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	12
2.1 Реагенты, оборудование и объекты исследования	33
Оборудование:	33
2.1 Методика выполнения эксперимента.....	33
2.1.1 Хроматографический анализ	33
2.1.2 Метод количественного измерения	34

3	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	35
3.1	Подбор хроматографических условий.....	35
3.2	Количественное определение витаминов: В ₁ , В ₆ и В ₁₂	40
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	46

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АОАС	Ассоциация Аналитических Сообществ
ТПФ	Тиаминпирофосфат
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ТСХ	Тонкослойная хроматография
НФ	Неподвижная фаза
ПФ	Подвижная фаза
СФ	Спектрофотометрический
ОФ ВЭЖХ	Обращенно-фазовая ВЭЖХ
ИОХ	Ионообменная хроматография
УФ	Ультрафиолетовый
ЖХ	Жидкостная Хроматография
ЖРВ	Жирорастворимые витамины
ВДР	Водорастворимые витамины
Закон БЛБ	Закон Бугера — Ламберта — Бера
ГВЖХ	Гидрофильная высокоэффективная жидкостная хроматография

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день самый значимый и обширный метод определения веществ: как лекарственных препаратов, так и водорастворимых витаминов, является высокоэффективная жидкостная хроматография. Преимущества данного метода для пробоподготовки просты и эффективны, в отличие от других методов: высокая чувствительность, быстрота, эффективное разделение и подходящие условия для проведения анализа.

Однако популярность начал набирать такой вид ВЭЖХ как гидрофильная хроматография, который может использоваться как самостоятельный метод. Главным отличием является состав элюента - это ацетонитрил с буферными добавками. А полярная подвижная фаза легко взаимодействует с такой же полярной неподвижной фазой. Данный тандем фаз дает хорошее удерживание водорастворимых продуктов, в частности витаминов. В данном режиме есть еще один фактор, разделение идет в комбинации с ультрафиолетовыми датчиками, тем самым позволяя одновременно определить сразу несколько длин волн. Избирательность ГВЭЖХ делает этот метод одним из самых перспективных на сегодняшний день.

Основной целью выпускной работы является оценка возможностей гидрофильной жидкостной хроматографии в анализе продуктов питания, содержащих витамины группы В, и количественное определение В₁, В₆, В₁₂ в образцах.

Задачи, входящие в работу:

- подготовить литературный обзор с оценкой возможностей различных вариантов ВЭЖХ в анализе продуктов, содержащих витамины В;
- подобрать подходящую методику и хроматографическую систему для определения витаминов (В₁, В₆, В₁₂);

- построить градуировочную зависимость для проведения количественного анализа методом абсолютной градуировки и определить содержание витаминов (V_1, V_6, V_{12}) в некоторых продуктах питания;
- дать оценку возможностям выбранной хроматографической системы в анализе образцов некоторых продуктов питания.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Строение и биологическая роль витаминов группы В

1.1.1 Витамин В₁

Тиамин или же В₁, является первым представителем водорастворимых витаминов группы В. Так же В₁ был первым витамином кристаллической формы, выделенным в 1912 году, профессором К. Функом. (рис.1.) Чуть позднее был проведен ряд химических опытов с ним. Название «тиамин» произошел от того что, наравне с содержанием аминогруппы, в структуре присутствуют и атомы серы. Основу составляют два гетероциклических кольца – аминопиримидиновое и тиазоловое, соединенных метиленовым мостиком. Эти же системы могут синтезироваться отдельно друг от друга, но в конечном итоге соединятся через четвертичный атом азота. [1-3] (рисунок 1).

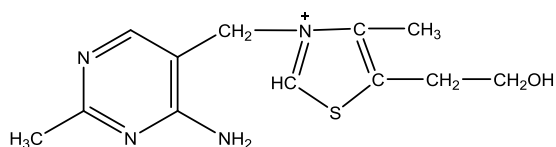
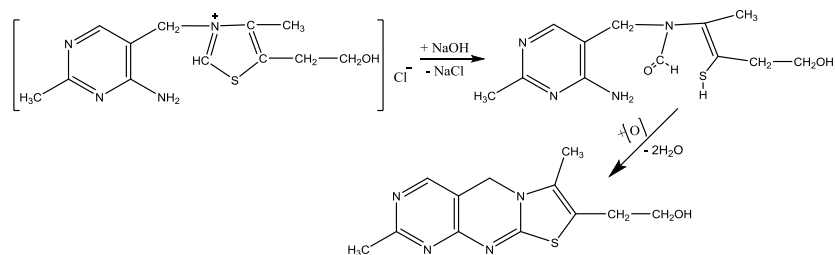


Рисунок 1- Строение тиамина

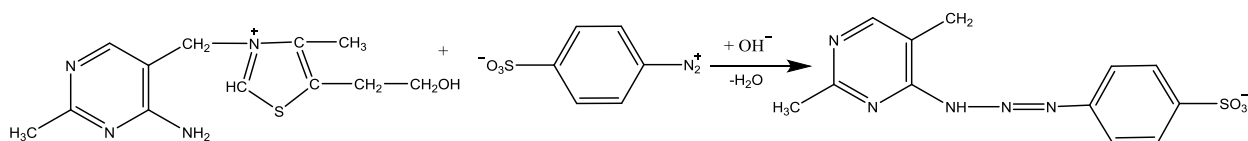
По химическим свойствам, продукты тиамина хорошо окисляются в щелочной среде, где образовывается тioxром. Отличительная его способность в том, что при УФ-свете он дает синюю флюоресценцию. Такую реакцию называли «тиохромная проба», т.к. она является отличительной для этой группы тиамина (схема 2). Уникальность этой реакции заключается в том, что если подкислить раствор окраска пропадает, если же добавить вновь немного щелочи, цвет снова проявится.

Схема 2



В целом, тиохромную пробу применяют для получения точного и качественного люминесцентного анализа витамина В₁ в фармакопии, растительных и пищевых продуктах. Для спектрофотометрического и фотоэлектроколориметрического количественного анализа витамина В₁ в растворах, используют тиамин в слабощелочной среде, бывает что и в нейтральной. Т.к. тиамин взаимодействует с солями диазония, образуя триазены красного цвета. [4] (схема 3)

Схема 3



В кислых же средах, тиамин хорошо сохраняет свои свойства, даже при нагреве с высокими температурами, не ухудшая свою биологическую активность.

Говоря про биологическую роль витамина В₁, следует отметить, что в форме ТПФ (тиаминпирофосфат) он является частью 5 биокатализаторов (ферментов), которые участвуют в промежуточных фазах обмена веществ. Сам же ТПФ содержится в 2 сложных ферментативных системах: пируват и α-кетоглутаратдегидрогеназных комплексов, и так же является коферментом дрожжей. Помимо этих функций, ТПФ содержит еще немало других функций.

Роль тиамина в природе велика, он содержится как в растениях, так и в продуктах животного происхождения. К примеру, зерновые

продукты (дрожжи, пшеница), морковь, печень, почки, мозг. Суточная потребность составляет – 0.10-2,2 мг. [1].

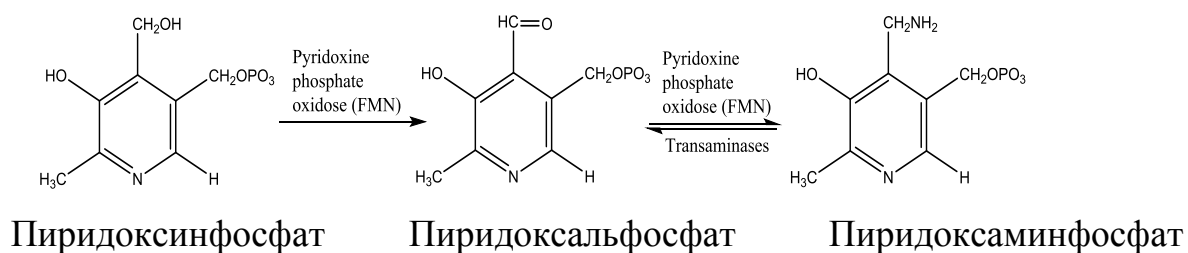
1.1.2 Витамин В₆

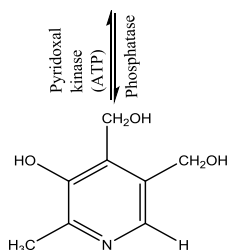
Сейчас, в каждом магазине здорового питания или спортивном центре предоставлено множество вариантов витаминов и минеральных добавок. Одной витаминной добавкой, часто используемой спортсменами, является витамин В₆. Этот витамин часто добавляют к продуктам, утверждая, что он увеличивает силу, уменьшает жировые отложения и уменьшает усталость и повреждение мышечной ткани. Как правило, эти продукты также имеют тенденцию к высокому содержанию белка и состоят либо из белковых порошков, либо из отдельных аминокислот [5].

Витамин В₆ - это общий термин, используемый для описания всех биологически активных форм витамина В₆. Он был открыт П. Дьерди в 1934г. как независимый пищевой фактор, но выделен в 1938г. из дрожжей и печени. А в скором времени были проведены различные синтезы.

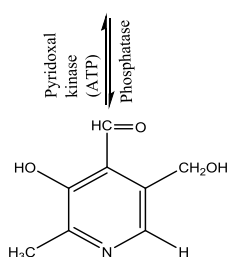
Формы включают пиридоксин (PN), пиридоксаль (PL), пиридоксамин (PM), пиридоксин-5'-фосфат (PNP), пиридоксал-5'-фосфат (PLP) и пиридоксамин 5'-фосфат (PMP) [5]. Тем самым являясь производным 3-оксипиридина. (схема 4)

Схема 4

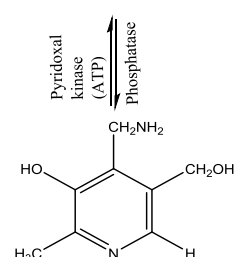




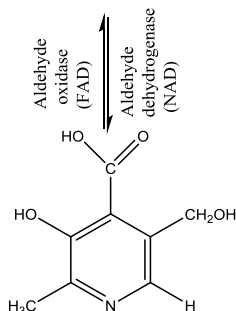
Пиридоксин



Пиридоксаль



Пиридоксамин

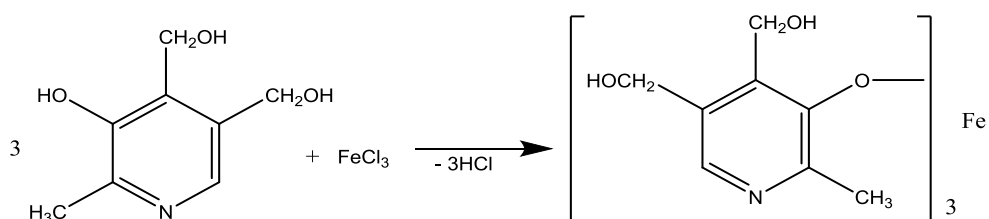


4-пиридоксиновая кислота

Производные 3-оксипиридина различны между собой структурой замещающей группы в положении 4 пиридинового центра (ядра).

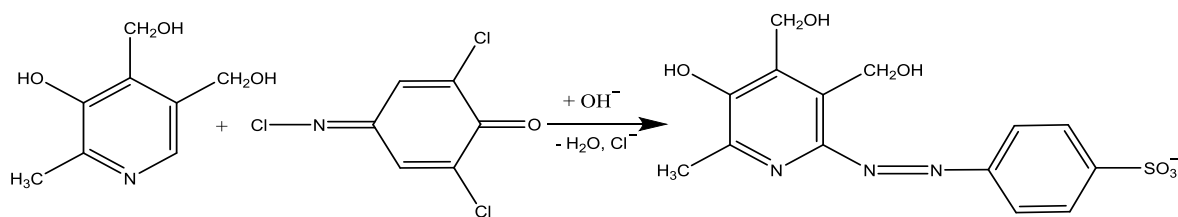
Большая часть витаминов В₆ выражают свойства, похожие с фенолами, например, реакция на фенолы с хлорным железом, идет как электрофильное замещение по свободному пара-положению к фенольному гидроксилу. Так проводят реакцию для распознавания и количественного анализа витамина В₆. (схема 5)

Схема 5



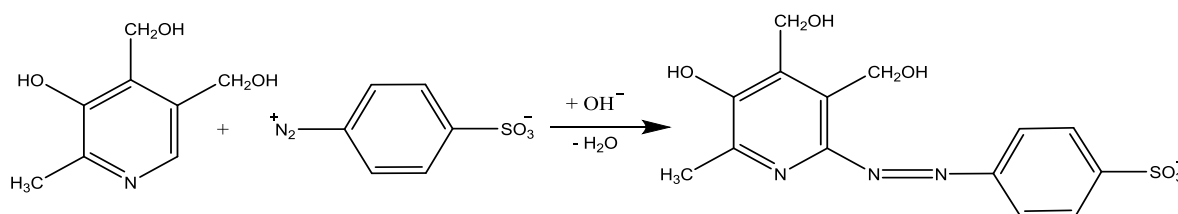
Когда пиридоксин взаимодействует с 2,6-дихлорхинон-N-хлоримидом в щелочной среде, индофенольный краситель, растворимый в бутиловом спирте, окрашивается в синий цвет (схема 6).

Схема 6



Кроме того, пиридоксин легко реагирует с азосоединением с солями диазония с образованием азокрасителей, окрашенных в красный цвет (схема 7).

Схема 7



Реакция образования азокрасителей происходит при присоединении соли диазония, полученной из сульфаниловой кислоты, в дальнейшем ее применяют в количественном фотоэлектроколориметрическом анализе витаминов группы B_6 [4].

По физическим функциям витамин B_6 хорошо растворяется в воде и этаноле. Водные растворы, вполне стабильны при добавлении к ним щелочи или кислоты, но крайне светочувствительны, находясь в индифферентной рН среде [1-2].

О биологической роли данного витамина написано много. В частности, B_6 в течение некоторого времени был вовлечен в метаболизм белка. И совсем недавно была обнаружена специфическая функция пиридоксала в коэнзиме тирозиндекарбоксилазы, а открытие этой функции распространилось и на декарбоксилазы аминокислот в целом. Все члены группы витамина B_6 (пиридоксин, пиридоксал, пиридоксамин) превращаются в этот кофермент теми организмами,

которые используют их в качестве источника витамина В₆. Структура кофермента не является точной, но свойства достаточно хорошо известны, чтобы показать, что это фосфорилированное производное пиридоксала и предложить возможное положение сцепления-связи. Натуральные и синтетические препараты коэнзима, которые обладают аналогичными свойствами, называются здесь как пиридоксаль фосфат или кодекарбоксилаза без дальнейшего уточнения структуры. Функция кодекарбоксилаза в декарбоксилировании аминокислот обеспечивает ему место в любом рассмотрении белкового обмена, но это не единственная функция группы витамина В₆ [6].

По биологической своей активной форме пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) витамина В₆, так же является и важным кофактором в метаболизме аминокислот, оказывая защитное действие во многих заболеваниях, он может также модулировать активность рецепторов стероидных гормонов и факторов транскрипции [7].

Дефицит витамина может влиять на функцию памяти и может способствовать возрастной когнитивной недостаточности. Витамин В₆, содержащий три химически различных соединения, участвует в регуляции психической функции и настроения. Витамин В₆ также является важным кофактором реметилирования гомоцистеина, а его дефицит связан с повышением уровня гомоцистеина в крови. Гомоцистеин является фактором риска развития цереброваскулярных заболеваний и может также оказывать прямое токсическое воздействие на нейроны центральной нервной системы. Нейропсихиатрические расстройства, включая судороги, мигрень, хронические боли и депрессию, которые были связаны с дефицитом витамина В₆. Эпидемиологические исследования показывают, что низкий уровень витамина В₆ является распространенным явлением среди пожилых людей. [8] Для пиридоксина сложно назвать суточную дозу

потребления для человека, т.к. он синтезируется кишечной микрофлорой, частично перекрывает потребность в нем, у организма. Но предполагаемые расчеты показывают, что человеку необходимо в сутки около 2мг.

1.1.3 Витамин B_{12}

Одна из самых заманчивых и увлекательных молекул в мире науки и медицины является витамин B_{12} (кобаламин), который первоначально был обнаружен как фактор против пернициозной анемии. Биосинтез этого существенного питательного вещества является сложным, ограниченным некоторым членам прокариотического мира, по-видимому, который никогда не должен был привести к эукариотическому переходу. [9] Говоря о структуре, витамина B_{12} , то она была настолько сложной, что обычные методы органической химии не позволяли определить ее структуру. Однако Д. Кроуфут-Ходжкин применила разработанный ею метод рентгеноструктурного анализа для определения структуры кобаламина. После 8 лет напряженной работы ей удалось установить структуру этого витамина. За что была удостоена Нобелевской премии [1].

Строение кобаламина используется для описания соединений семейства корриноидов кобальта, в частности семейств кобаламиновой группы. Конечными продуктами, происходящими в природе от биосинтеза витамина B_{12} , являются 5'-деоксиаденозилкобаламин (кофермент B_{12}) и $MeCbl$, тогда как витамин B_{12} по определению является цианокобаламином ($CNCbl$), который представляет собой форму, выпускаемую преимущественно промышленностью (рисунок 2). Группа CN является результатом процедуры экстракции, посредством которой соединение удаляется из бактериальных культур [9]. Химические исследования биосинтеза витамина B_{12} показали, что А / D-кольцевой переход, рассматриваемый как основное препятствие для химического синтеза

витамина В₁₂, идет с самого начала. На самом деле, кольцо является структурным элементом, который образуется легко и разнообразно из структур соответствующих предшественникам [12]. Природными формами являются аденозилкобаламин, метилкобаламин и гидроксикобаламин. Витамин В₁₂ считается уникальным витамином, потому что его синтезируют только микроорганизмы, и ни кто более. В организм человека он поступает через продукты питания, такие как: мясо, рыба, молочная продукция и т.п. [2]. В нашем организме он накапливается в печени и синтезируется микрофлорой кишечника, но в очень малых дозах [1, 10, 11].

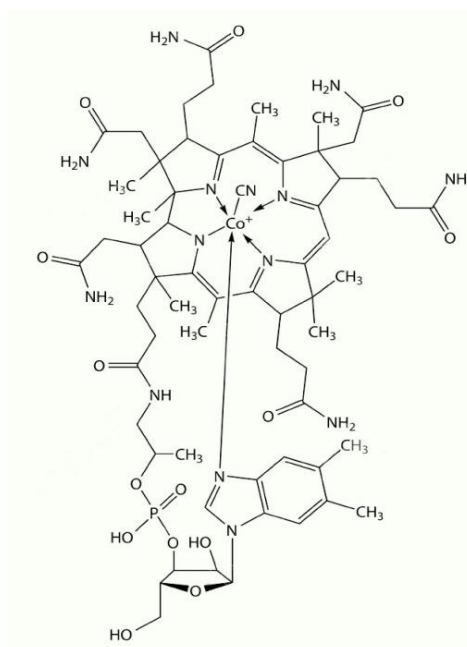


Рисунок 2- строение цианокобаламина

Недостаток кобаламина приводит к повышенной утомляемости, покалыванию и онемению конечностей, анемии, повышение холестерина и проблемам с памятью.

Рекомендованная доза суточной потребности для взрослого составляет от 1 до 3 микрограммов в сутки.

1.2 Методы анализа и фармацевтического контроля витаминов группы В.

1.2.1 Исследование образцов, содержащих витамины В.

1.2.1.1 Анализ продуктов питания, содержащих витамины В.

В наше время, в технологии пищевой промышленности широко используются витамины группы В для создания продуктов питания. Таким образом, процесс исследования и улучшения методов их распознавания нуждаются в тестировании, как для производственного процесса, так и для ГОС контроля качества продукции. Ограничивающим этапом анализа витаминов группы В является подготовка проб, включающая выделение витаминов из сложного пищевого матрикса (кислота, ферментативный гидролиз), очистка гидролизата и концентрация анализируемого вещества. Для того чтобы правильно контролировать водорастворимый витаминный состав в обогащенных продуктах для мониторинга соответствия, а также для создания точных банков данных, необходим точный аналитический метод. В течение многих лет для анализа витаминов группы В применялись микробиологические анализы. Однако они больше не считаются золотым стандартом в анализе витаминов, поскольку многие исследования выявили их недостатки [13]. На смену такого нестабильного анализа пришли к использованию биосенсора. Технология поверхностного плазменного резонансного биосенсора (SPR) проста. Она используется с взаимодействием лигандсвязывающего белка и диффундирует через полупроницаемую мембрану в тонкий слой биокатализатора. Подход, основанный на биосенсорах/иммуноанализе, продолжает демонстрировать определенные перспективы для будущего, особенно если он принят в качестве официальной процедуры АОАС. Новые разработки, такие как более специфичные связывающие белки и более мелкие многоканальные

устройства, должны способствовать дальнейшему его принятию [14]. На данный момент широко используются в анализе продуктов такие методы, как хроматографические. К примеру, для получения общего содержания тиамин (В₁) в экстракте пищевых продуктов, обычно проводят автоклавирование [14]; Трудно полностью извлечь витамин В₁ из продуктов, но использование 0,5н НСl вместо 0,1н НСl увеличивает восстановление. Обычно используют предколонную дериватизацию, что позволяет использовать хроматографию с обращенной фазой разделение. Однако растворы необходимо вводить сразу после образования тиохрома. Деривация столбцов должна быть более удобной для рутинного анализа, поскольку процедура ЖХ может быть автоматизирована, избегая ручных инъекций; К сожалению, на практике чувствительность несколько ниже, и она не часто применяется.

Что нельзя сказать об определении витамина В₆. Витамин выделяется из пищи с помощью экстракции [15] или кислотным гидролизом 0,1н НСl или дефосфорилируется ферментативно [14]. Пиридоксамин превращают в пиридоксаль путем реакции с глиоксиловой кислотой в присутствии Fe²⁺, и пиридоксаль восстанавливают до пиридоксина под действием боргидрида натрия в щелочной среде. Затем витамин В₆ оценивают количественно как пиридоксин в растворе образца с помощью ЖХ с флуорометрическим детектированием. Аналогичный метод ЖХ был подтвержден для определения витамина В₆ в детском питании (молоко и соевые) [18,19].

Другой метод был опубликован для определение общего количества витамина В₆ (включая его гликозилированные формы). Производные разделяют с помощью ЖХ и количественно определяют флуориметрией. Метод был подтвержден с использованием детского питания на основе манной крупы, картофельного пюре, продукта, содержащего овощи и ветчину, и напитка с мультивитамином [14].

Но на этом методы анализов по определению пиридоксала не закончились. Так, для определения отдельных витаминов В₆ в пищевых продуктах и других биологических материалах был разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с парной ионной обратной фазой. Образцы экстрагировали сульфосалициловой кислотой, и экстракты очищались с помощью препаративной анионообменной хроматографии [16].

В дополнение к большей точности методы ВЭЖХ позволяют прямое определение концентрации отдельных витаминов В₆, результаты которых были выгодно сопоставлены с ранее представленными данными для различных образцов. Эта процедура является удобной альтернативой предыдущим методам определения витамина В₆ [16].

Поскольку витамин В₁₂ является водорастворимым и нелетучим, его обычно можно анализировать с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Однако, поскольку количество витамина В₁₂ в пищевых продуктах обычно составляет всего несколько мкг/100г по сравнению с другими витаминами, общий анализ ВЭЖХ не позволяет точно определить содержание. Из-за этого ограничения вместо этого используют инструментальный анализ методом микро-ВЭЖХ с использованием системы концентрации тестового раствора, называемой переключающим клапаном. Однако в тех случаях, когда элементы, содержащиеся в продукте, находятся в небольших количествах, необходимы более чувствительные методы инструментального анализа, чтобы гарантировать, что количество, указанное на этикетке для пищевых продуктов, является точным и позволяет лучше контролировать качество и контроль над продуктами [17].

Так же была описана новая процедура ЖХ-УФ для определения свободного и общего витамина В₁₂ в пищевых продуктах и примесях.

Общий витамин В₁₂ экстрагировали из пищевых продуктов буфером ацетата натрия с рН 4,0 в присутствии цианида натрия с последующей ферментативной обработкой альфа-амилазой и пепсином [14].

Таким образом, с каждым годом методы анализов по определению витаминов в продуктах увеличиваются, но из всех, преобладает метод ВЭЖХ, где преимущественно высокая эффективность разделения, экспресс результат в различных условиях проведения анализа. К примеру, в работе «Определение витаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в премикасах, биологически активных добавках и пищевых продуктах» условиями определения водорастворимых витаминов группы В является элюент бинарного типа с подвижными фазами, в основе которых находятся ацетонитрил, тетрагидрофуран и метанол. [20]

1.2.1.2 Анализ фармацевтических препаратов, содержащих витамины В.

Определение витаминов в фармацевтических препаратах и в биологических материалах методом ВЭЖХ часто осложняется присутствием большим избытком неактивных веществ и низкими концентрациями витаминов. В статье [21] описан метод жидкостной хроматографии для совместного определения витаминов В₁, В₂, В₆ и В₁₂ в фармацевтических препаратах, аналогичный ему метод ВЭЖХ с ионно-парной реверсированной фазой для разделения и одновременного определения [22]. Тем не менее, только ограниченное внимание было уделено фармацевтическому анализу. Метод электрофореза в капиллярной зоне показал, что водорастворимые витаминные соединения легко ионизируются, за исключением никотинамида, тем самым показывая, что капиллярный электрофорез показал ценную альтернативу ЖХ [21].

Для определения витамина В₁₂ был разработан флуориметрический метод. Он использовался для определения витамина В₁₂ в фармацевтических препаратах. Восстановление составило 96% - 98%, а относительное стандартное отклонение составило 1,8-2,7%. Основное преимущество метода является его высокая чувствительность, что примерно в 100 раз больше, чем в спектрофотометрии [23].

Большинство опытов для обозначения группы В - это ряд аналитических методов. К ним относятся УФ-спектрометрические, спектрофлуориметрические, масс-спектрометрические, тонкослойные и высокоэффективные жидкостные хроматографические, электрофоретические, электрохимические и ферментативные методы. Большинство из этих методов способны определять водорастворимую группу, в присутствии других витаминов и сложных систем в количествах мг.

1.2.1.3 Анализ биологических материалов, содержащих витамины В.

При выборе методики для биологических материалов витаминов В, надо учитывать процедуры, которые были разработаны для определения 4-пиридоксиновой кислоты в моче, основного конечного продукта метаболизма витамина В у видов млекопитающих. Кровь - это биологический материал, представляющий первостепенный интерес в лаборатории, поскольку он является наиболее доступной для прямого анализа любого питательного компонента. Хотя микробиологические, химические и ферментативные методы определения оказались удовлетворительными для измерения витамина В₆ в чистом растворе. При применении этих методов к биологическим материалам, особенно при анализе крови, возникают проблемы. Так как витамин связан с фосфорилированными и белковыми комплексами, то в биологических материалах обычно требуется предварительная экстракция для

высвобождения витамина в измеримой форме. Эта процедура и обуславливает большинство трудностей, возникающих при разработке удовлетворительных методов анализа крови [24]. В отличие от предыдущего метода, новый метод более чувствительный и специфический. Он описывает способы определения соединений В6 в крови и моче. О'Коннор и Сэмпсон разработали метод ВЭЖХ для анализа метаболитов витамина В6, включая экскреторную форму, подходящую для плазмы, тканей и мочи. Метод основан на модификациях процедуры ионно-спаривания в обращенной фазе и может быть использован для отделения пиридоксальфосфата, пиридоксаминфосфата, пиридоксала, пиридоксина, пиридоксамина и пиридоксиновой кислоты в образцах от лабораторных животных и людей. Пределы обнаружения были достаточны для того, чтобы позволить провести точный анализ образцов, которые содержат низкие концентрации витаминов В6, таких как плазма у людей и животных при предельном или недостаточном питательном статусе В6 [25].

Метод ВЭЖХ является предпочтительным и для исследования такого биологического материала, как грудное молоко. Было проведено много исследований определения витаминов группы В такого рода материала, т.к. часто из-за не правильного питания или образа жизни возникает дефицит витаминов (в частности В₁₂ и В₆) у женщин с лактационным периодом [26-33]. Для окончательных решений применения методов для биологических материалов надо дожидаться разрешения для их использования.

1.3 Спектрофотометрические методы

Спектрофотометрия по-прежнему является одним из распространенных методов, используемых для определения

водорастворимых витаминов, благодаря своей простоте и высокой точности. В настоящее время, наиболее изученным и применяемым методом является ультрафиолетовая спектрофотометрия. Такие характеристики как: чувствительность и селективность в значительной степени увеличены. Однако известно несколько методов для определения витаминов В с использованием визуальной спектрофотометрии, и большинство из них не имели высокой чувствительности или хорошей селективности. Поэтому для определения важно разработать простой, быстрый и высокочувствительный визуальный спектрофотометрический метод. Так в статье [34] предложили метод экстракционно-спектрофотометрическое определение на основе реакции ион-ассоциации с бромтимоловым синим, но у метода есть и недостатки. А в статье [35] описан метод твердофазной спектрометрии, сравнительно недавний метод, который продемонстрировал свою применимость к широкому спектру образцов. Он показывает несколько характерных особенностей, таких как сильное увеличение селективности, более низкие пределы обнаружения и очень высокое повышение чувствительности по сравнению с теми же процедурами в области спектрофотометрии гомогенного раствора. Однако этот методика в УФ-области практически не используется. Минусы спектрофотометрии: продукт реакции трудно растворяется в воде, экстракция идет с использованием ядовитого органического растворителя [36].

1.4 Хроматографические методы

Витамины представляют собой структурно-гетерогенные вещества, которые нуждаются в сложных хроматографических методах для их разделения и определения [37-39]. Так, к примеру, для определения жирорастворимых витаминов применяют метод ТСХ [40]. Преимущества

такого метода - дешевизна и легкость в использовании, проводимости анализов, а что самое важное – быстрота получения результатов. Недостатками являются то, что применяются только к ЖРВ. Так же для определения водорастворимых витаминов используют относительно новый метод ионной хроматографии [41-45]. Достоинства ИОХ - определение элементов, присутствующих в одном образце. Но так как метод не до конца опробован, это и является его минусом. Помимо выше описанных методов используются варианты разделения газо-жидкостной (ГЖХ) [46], эксклюзионной хроматографии, где разделение основано на разности в размерах молекул и их пространственной структуре [47] и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [48,49]. В зависимости от состава анализируемой смеси определяется механизм, который позволил бы разделить компоненты наиболее эффективно. В зависимости от механизма разделения определяются сорбент и элюент. Необходимо также иметь в виду, что на практике при любых условиях разделения так или иначе проявляться могут все механизмы, выделяют обычно преобладающий из них, который оказывает решающее влияние на процесс разделения. Однако чем сильнее различие в природе анализируемых компонентов, тем больше вероятность того, что в силу может вступить какой-то другой механизм.

Высокоэффективная жидкостная хроматография – это метод разделения и анализа сложных смесей, получивший широкое распространение, как в аналитической химии, так и в химической технологии. Она является важным и практически не заменимым методом в определении витаминов, как в фармацевтических препаратах, так и в продуктах питания. Особенность ВЭЖХ заключается, очевидно, в высокой эффективности разделения. Достигается она путем использования мелкозернистых сорбентов в качестве неподвижной фазы (до 1,8 мкм) и высокого давления (до 400 бар), что позволяет разделять вещества полно и

быстро. В зависимости от типа детектора определяется чувствительность количественного определения. Рассматривая распределительную ВЭЖХ, как самую распространённую в настоящее время, важно знать, что она подразделяется на 2 типа: исторически первым является нормально-фазовый вариант ВЭЖХ. В этом случае используют полярный сорбент и неполярную подвижную фазу. Сорбентами могут быть силикагель с привитыми полярными группами. Например: нитрильными, аминными, диоловыми и т.д. Реже используют неорганические сорбенты. Элюентом служат смеси органических растворителей (неполярные с полярными): алканов, аренов, эфиров, кетонов, спиртов и др. При пропускании элюента растворители перераспределяются в системе, на сорбенте ассоциируются молекулы полярного растворителя, способного к образованию водородных связей, неполярный же растворитель играет роль подвижной фазы. Соответственно, при введении анализируемой смеси, на неподвижной фазе будут задерживаться более полярные вещества, неполярные же будут выходить первыми. В обращенно-фазовом варианте система наоборот: сорбент используем неполярный, элюент – полярный. Соответственно, первыми выходят более полярные вещества. Сорбентом обычно используют силикагель с привитыми группами алканов разной длины, а элюентами – смеси воды с водосовместимыми растворителями: метанол, ацетонитрил, диоксан, ТГФ.

Хоть и оба подхода, казалось бы, используют одинаковый принцип, механизм действия ОФ и НФ несколько отличается.

Различие в механизмах обусловлено взаимодействиями кулоновских сил компонентов с неподвижной фазой. Так, в НФ чем более полярный компонент, тем сильнее он удерживается, в случае ОФ соответственно наоборот. Обращенно-фазовый вариант является самым универсальным методом в настоящее время, позволяющим решать большинство задач. Он

используется более чем в 70% случаев. Обусловлено это тем, что, во-первых, он очень гибкий: в зависимости от того, с какой смесью мы имеем дело, можно подобрать оптимальный состав растворителя и разделить фактически любую смесь. Кроме того, метод позволяет анализировать вещества, растворимые как в воде, так и в органических растворителях, что значительно расширяет их диапазон. Также есть возможность использования буферных растворов, которые позволяют влиять на гидрофобность анализируемых компонентов. Нормально фазовый вариант чувствителен к рН-среды из-за вымывания привитых фаз с подложки.

Таким образом, в ОФ элюент способствует эффективному разделению, в НФ, напротив, создает дополнительные трудности для разделения.

За последние годы опубликовано много методов определения водорастворимых витаминов с использованием ВЭЖХ [50-51]. Однако их нахождение в фармацевтических препаратах и в биологических материалах часто осложняется большим избытком неактивных ингредиентов и низкими концентрациями витаминов в биологических жидкостях (диапазон нанограмм). В таких случаях используют метод с ОФ ионно-парной для разделения и одновременного определения витаминов В₁, В₂, В₆, В₁₂ и фолиевой кислоты в диапазоне нужных нанограмм [52-53]. ВЭЖХ является возможной альтернативой для анализа полярных соединений. Его можно описать как вариацию нормальной фазовой хроматографии, выполненную с использованием полярной стационарной фазы (например, немодифицированной диоксид кремния, амино-, циано или диола). Используемая подвижная фаза (>70% растворитель, обычно ацетонитрил), содержащий такой же небольшой процент водного растворителя / буфера или другого полярного растворителя. Водно-полярный растворитель образует обогащенный подслой, адсорбированный на полярной поверхности неподвижной фазы, в которую попадает анализируемое вещество.

Механизмы удерживания в таком методе являются сложными, но, как полагают, представляют собой комбинацию гидрофильного разделения и вторичного механизма электростатического и водородного связывания. Эти механизмы отражаются в порядке удерживания, который примерно противоположен порядку элюирования из колонки с обращенной фазой.

1.5 Гидрофильная хроматография

1.5.1 Основные методы

Особенность гидрофильной жидкостной хроматографии заключается в механизме разделения компонентов [54]. Поскольку подвижная фаза является жидкостью, а не газом, то здесь решающее действие на разделение оказывают Ван-дер-Ваальсовы силы взаимодействия компонентов с подвижной фазой, и разделение происходит в зависимости от их силы и природы. Жидкостной хроматограф состоит из нескольких основных блоков: узел подготовки ПФ, насосная система, система ввода пробы (инжектор), хроматографическая колонка, детектор, система сбора и обработки данных.

В гидрофильном режиме НФ используют полярные фазы, в частности – аминофаза, редко - силикагель. Элюент же берут ацетонитрил с буферными добавками, для лучшего разделения пиков.

Подготовка подвижной фазы может включать предварительное смешение элюента в нужных пропорциях и дегазирование. Дегазирование проводят для предотвращения попадания пузырьков воздуха, так как это может вызвать скачки давления в системе, что негативно отразится на хроматограмме. Подвижная фаза насосом подается в колонку, заполненную сорбентом. Сюда же, через систему ввода, подается анализируемая проба. Компоненты, проходя через

колонку, вступают во взаимодействие с сорбентом и задерживаются на поверхности сорбента с различным временем удерживания, в результате чего разделяются и выходят на детектор последовательно. В зависимости от типа детектора определяется чувствительность количественного определения.

Наибольшее распространение получили оптические детекторы, работающие в УФ и видимой областях спектра. Определение осуществляется по известному закону БЛБ, используя площадь хроматографического пика как количественную характеристику, пропорциональную концентрации. Широко используют стандартные методы количественного анализа, такие как внутренний стандарт, добавка, градуировка и т.д.

1.5.2 Гидрофильная ВЭЖХ в анализе витаминов

Применяемый метод простой, эффективный и быстрый для пробоподготовки. Он усовершенствовал предыдущие методики, предлагая легкий и надежный вариант с улучшенными хроматографическими условиями, которые заменили весьма точный метод для водорастворимых витаминов в широком диапазоне рецептур (табл.1) [54].

«Таблица 1. Длина волны детектирования и характеристики определения витаминов» [55]

Витамин	Длина волны, нм	Предел обнаружения, мг/л	Диапазон линейности, мг/л
Тиамин	244	0,01	0,01-100
Пиридоксин	292	0,02	0,02-100

Пиридоксаль	292	0,1	0,1-100
Цианокоболамин	360	0,2	0,2-50

Так же для определения ВДР витаминов применяют методику с градиентным элюированием. Основную часть определения проводят на колонке C_{18} с ПФ: ацетонитрил – вода, подкисленные H_3PO_4 . При оптимальных условиях УФ- детектирование проводят при таких длин волн, которые показывают наилучший предел обнаружения и поглощения, определяемого витамина и анализируемого образца. Так для тиаминa: 246нм, для пиридоксина: 280-292нм и для цианокобаламина: 273-361нм.

Разработаны надежные методики для определения каждого витамина в детских смесях [49,56]. Они подходят для быстрого определения продуктов, содержащих витамины группы В [55]. Существуют так же и методики по определению витаминов в грудном молоке [29-32] и их нормы содержания.

Такой метод дает возможность получения более быстрого эффективного результата. Гидрофильная ВЭЖХ может быть реализована в лабораториях и дает экономию труда.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Реагенты, оборудование и объекты исследования

Оборудование:

1. Жидкостной хроматограф со спектрофотометрическим детектором фирмы Agilent Technologies 1220
2. Хроматографический шприц Agilent 1220;
3. Колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм), произведена в Agilent;
4. Колонка хроматографическая ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм), произведена в Agilent;
5. Колонка хроматографическая ZORBAX NH₂ (4.6×150мм), произведена в Agilent;
6. Ультразвуковая ванна «Сапфир»;
7. Аналитические весы.

Реагенты: Фосфорная кислота, х.ч., дигидрофосфат калия, х.ч., ацетонитрил (Macron Fine Chemicals) в качестве элюента, дистиллированная вода.

Объекты исследования: молочная смесь «Малютка», грудное молоко, «Nestle», жевательные мармелад «Витамишки», витаминный комплекс «Компливит».

2.1 Методика выполнения эксперимента

2.1.1 Хроматографический анализ

ВЭЖХ анализ ВДР витаминов, продуктов питания и лекарственных препаратов на их основе, осуществляли на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1220, оборудованном УФ-спектрофотометрическим

детектором. Образцы исследовали при оптимальных условиях: длина волны составила 275 нм, объем вводимой пробы составил 20 мкл. Обработывали данные в программе LC 1220 OpenLAB online.

В качестве подвижной фазы брали ацетонитрил и однозамещенный фосфат калия с водой.

Для приготовления растворов витаминов использовали точные навески, взятые на аналитических весах, приливали 1мл фосфорной кислоты и 50мл деионизованной воды, подвергая ультразвуковой обработке при температуре не менее 25° до полного растворения. Полученный раствор довели до метки в колбе на 100 мл..

Для определения нужной колонки на примере стандартных растворов витаминов В₁, В₆ и В₁₂ проводили выбор между хроматографическими колонками ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм), ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм) и ZORBAX NH2 (4.6×150мм), а в качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил-буфер в соотношении 8:2.

Оптимальными условиями для разделения пиков витаминов в образцах в гидрофильном режиме были на колонке ZORBAX NH2 (4.6×150мм), а элюентом послужил ацетонитрил и однозамещенный фосфат калия с рН=2,5 в соотношении 8:2. Длина волны составила 275нм, объем вводимой пробы 20мкл.

2.1.2 Метод количественного измерения

Концентрацию ВДР витаминов, в рассматриваемых образцах, находим по методу абсолютной градуировки. Для их определения, прокалывали стандартные образцы В₁, В₆ и В₁₂, и по полученным значениям строили градуировочную кривую. Затем, по методу наименьших квадратов находим уравнение, в которое подставляли площади пиков В₁, В₆ и В₁₂ и определяли их количество, а также их процентное содержание в образце.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Подбор хроматографических условий

ЖХ имеет большую значимость на сегодняшний день в сфере фармакологических исследований. ВЭЖХ быстрый, точный и верный метод для одновременного определения витаминов В₁, В₆ и В₁₂ в детском питании и в ЛП.

Большие перспективы, на наш взгляд у метода гидрофильной хроматографии. На сегодняшний день большинство анализов полярных водорастворимых веществ проводится методом ОФ ВЭЖХ. Но на неполярной неподвижной фазе плохо делятся полярные сорбаты. Для их разделения прибегают к градиентному элюированию, термостатированию или другим приемам. В НФ ВЭЖХ сложность вызывает растворение сорбатов в неполярном элюенте и сильная сорбция на неподвижной фазе. Гидрофильная хроматография – это сочетание ОФ и НФ вариантов ВЭЖХ (полярные как подвижная, так и неподвижная фазы). Такая комбинация позволяет вести разделение полярных водорастворимых соединений. Работ по этому методу еще мало, он только начинает апробироваться на определенных объектах. Цель нашей работы исследовать, возможности гидрофильной хроматографии как альтернативы ВЭЖХ в анализе водорастворимых витаминов группы В. В том числе, подобрать такие условия, где достигалось бы разделение пиков смеси витаминов.

Для начала, мы провели проверку НФ для анализа наших витаминов на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). Элюент: ацетонитрил-вода 8:2. На рисунке 3 можем видеть, что компоненты элюируются быстро и не удерживаются в данном варианте анализа.

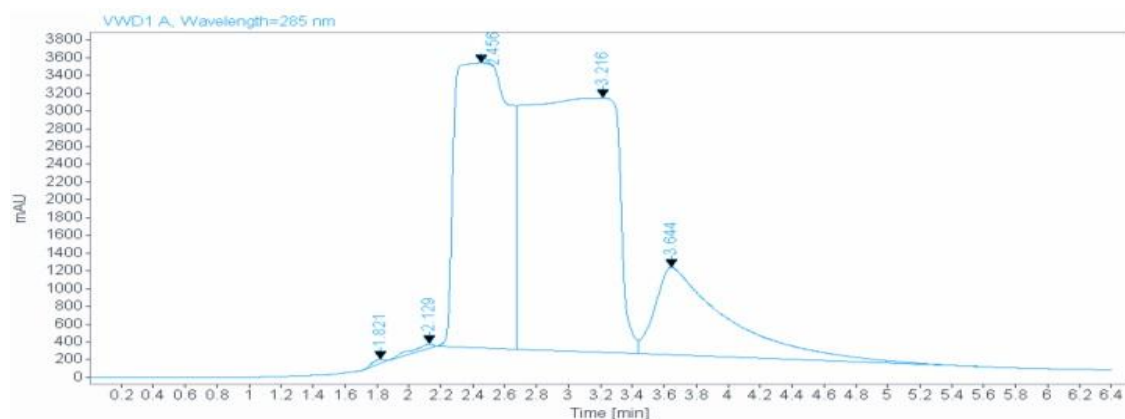


Рисунок 3–НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). Элюент:

ацетонитрил-вода 8:2, СФД 275 нм, скорость потока 0.6 мл/мин

Подобным неразделенным пиком выходят образцы и на колонке ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм).

Самым оптимальной НФ для нас стала колонка с аминофазой (NH_2), а в качестве элюента - буферный раствор ацетонитрил-вода в соотношении 8:2. Результаты анализа показали высокую эффективность и хорошее разделение пиков рассматриваемых образцов. На рисунках 4,5,6 мы можем это увидеть на примерах витаминов B_1 , B_6 , B_{12} .

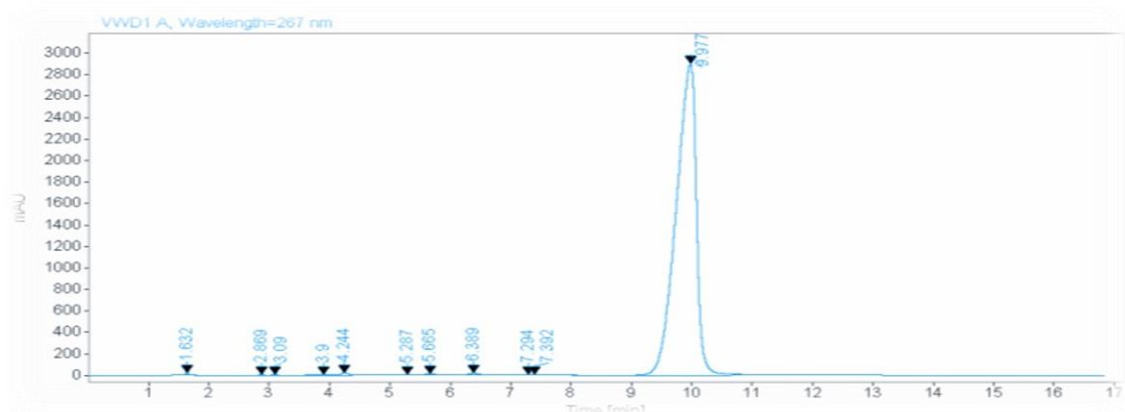


Рисунок 4– B_1 на NH_2 . Элюент: ацетонитрил-буфер 8:2, СФД-267 нм.

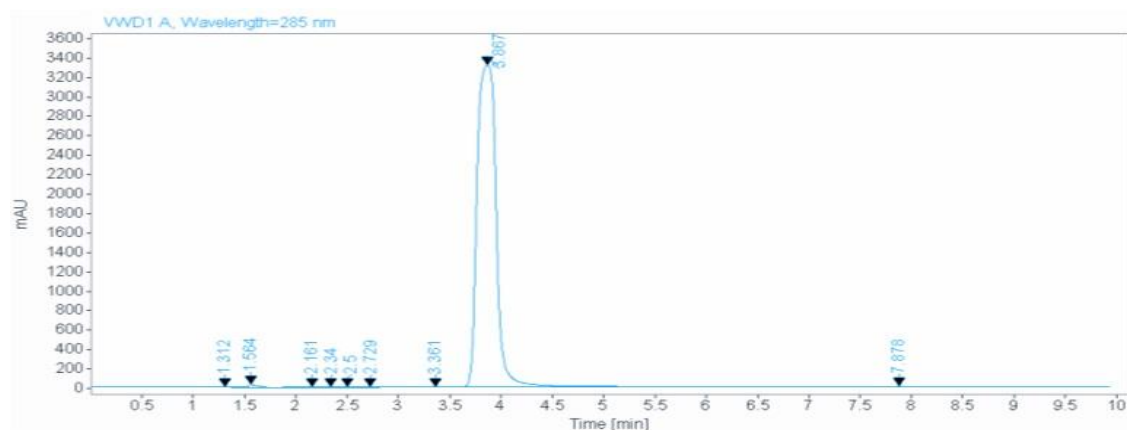


Рисунок 5 – В₆ на NH₂. Элюент: ацетонитрил-буфер 8:2, СФД-285
нм.

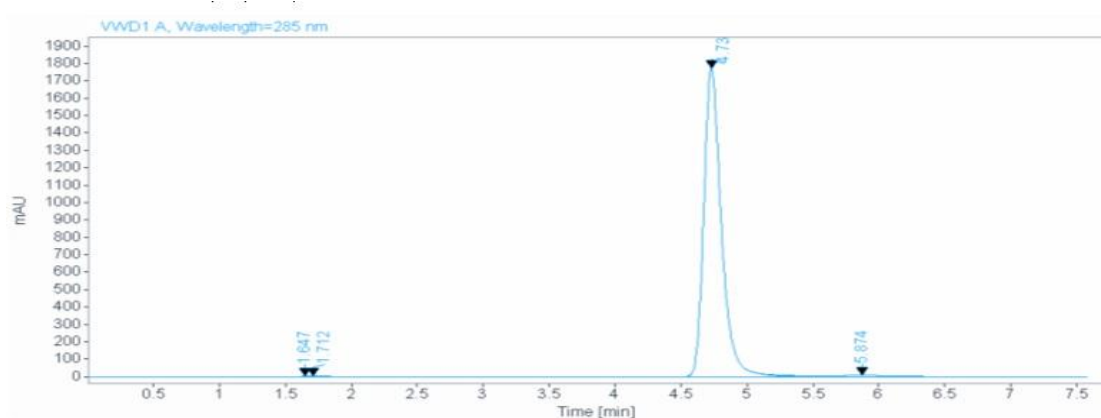


Рисунок 6 – В₁₂ на NH₂. Элюент: ацетонитрил-буфер 8:2, СФД-
273нм.

После выбора необходимой хроматографической системы для анализа, мы проанализировали следующие объекты: сухую молочную смесь для приготовления детского питания «Малютка», грудное молоко, молочная каша «Nestle» (сухая смесь), жевательные мармелад «Витамишки» и витаминный комплекс «Компливит» (Рисунок 7-11).

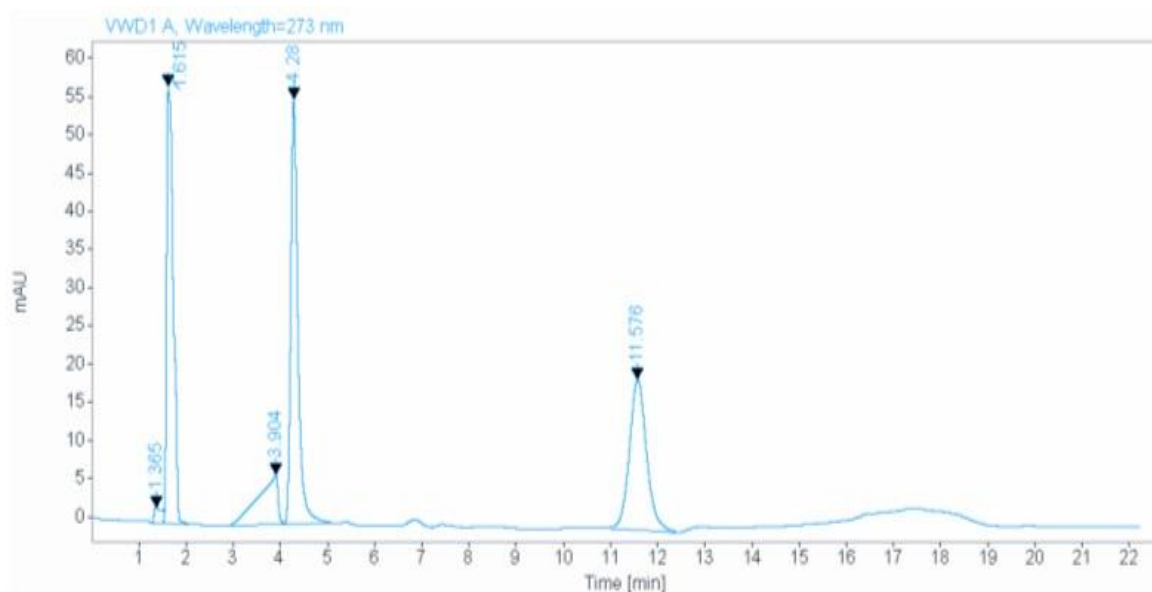


Рисунок 7– Анализ сухой смеси «Малютка». НФ: ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-буфер 8:2, спектрофотометрический детектор с длиной волны 275нм, скорость потока 1мл/мин.

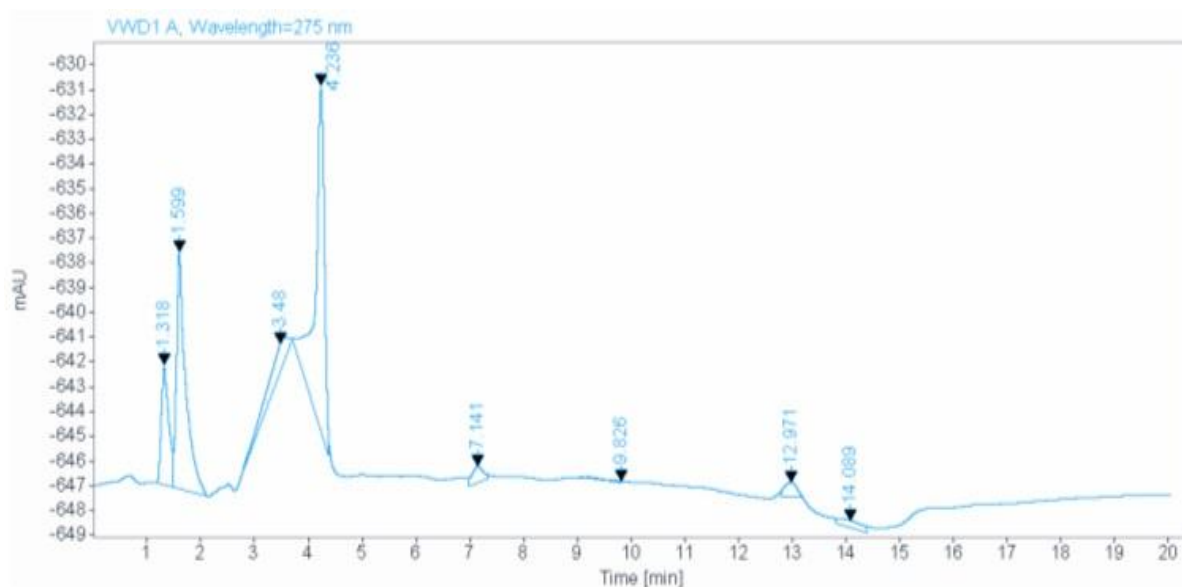


Рисунок 8– Анализ грудного молока. НФ: ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-буфер 8:2, спектрофотометрический детектор с длиной волны 275нм, скорость потока 1мл/мин.

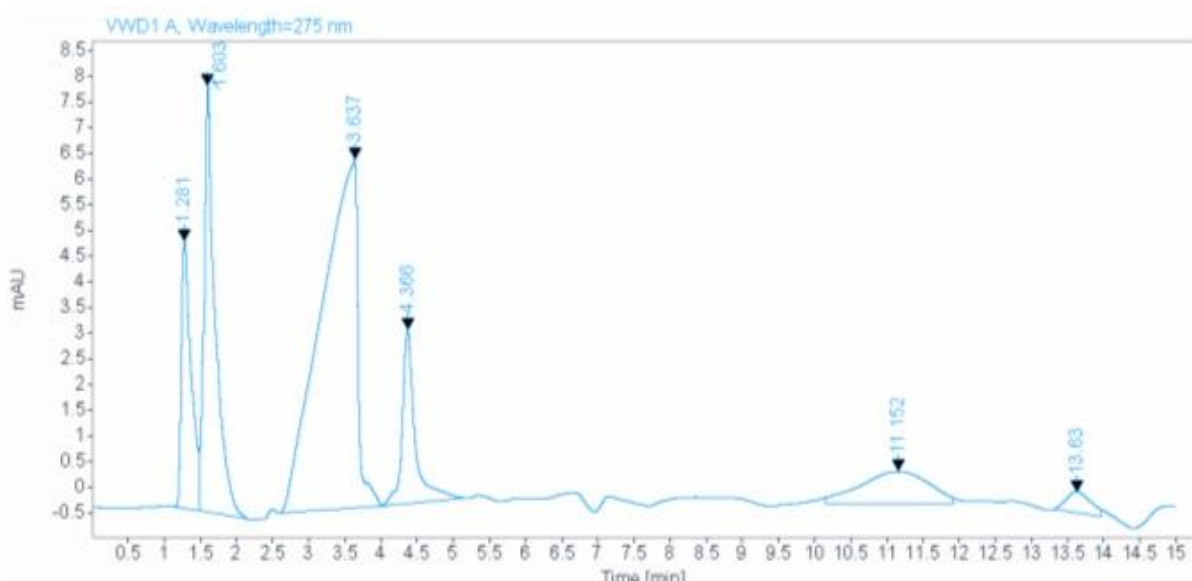


Рисунок 9 – Анализ жевательного мармелада «Витамишки». НФ:

ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-буфер 8:2,

спектрофотометрический детектор с длиной волны 275нм, скорость потока 1мл/мин.

Из хроматограмм видно, пики витаминов В₁, В₆, В₁₂ в рассматриваемых образцах присутствуют, и для определения их концентрации в веществах использовали метод абсолютной градуировки.

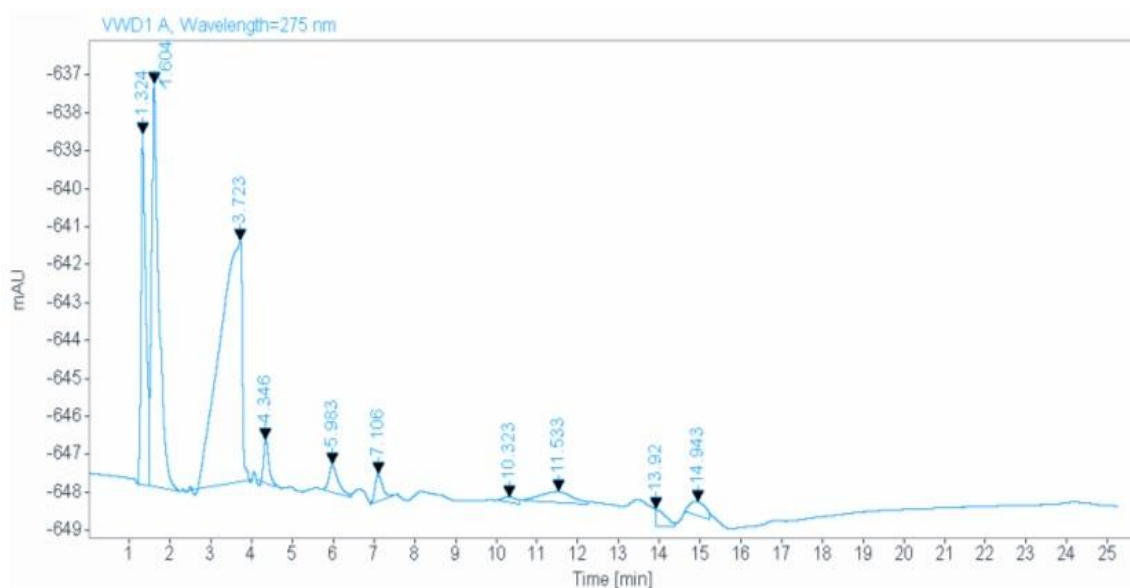


Рисунок 10 – Анализ сухой каши «Nestle». НФ: ZORBAX NH₂

(4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-буфер 8:2, спектрофотометрический детектор с длиной волны 275нм, скорость потока 1мл/мин.

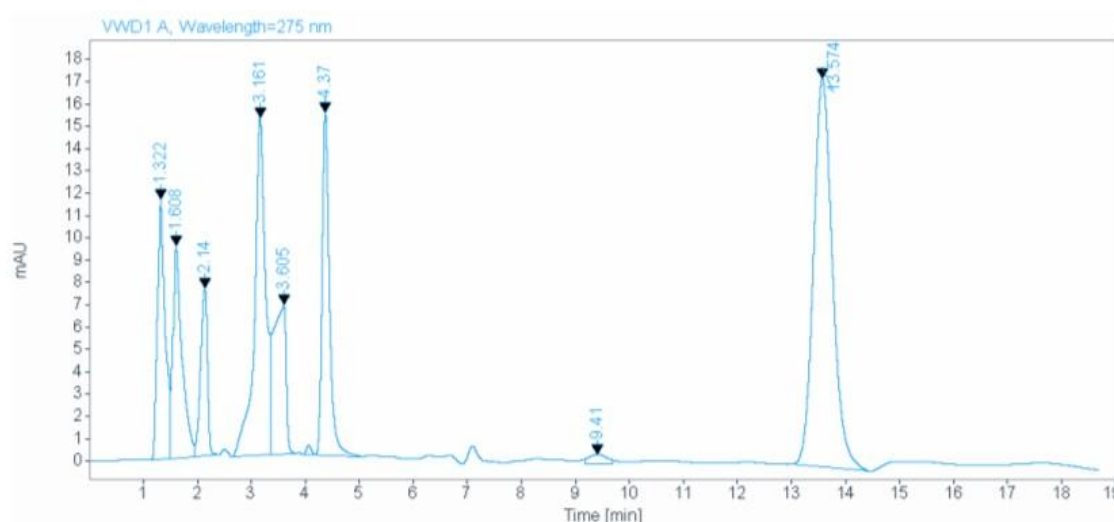


Рисунок 11 – Анализ витаминного комплекс «Компливит». НФ: ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-буфер 8:2, спектрофотометрический детектор с длиной волны 275нм, скорость потока 1мл/мин.

3.2 Количественное определение витаминов: В₁, В₆ и В₁₂

Водорастворимые витамины являются жизненно необходимые микроэлементами. Но организм не может синтезировать их в достаточном количестве, поэтому большинство этих витаминов поступают в организм с пищей или добавками. Так, какой либо недостаток из перечисленных витаминов могут оказать негативное воздействие на здоровье. Исследуемые нами образцы, мы проверили на соответствие содержания в них витаминов нормам. Для каждого витамина мы построили градуировочную кривую в координатах площадь пика от концентрации стандартного раствора витамина (рисунки 12-14)

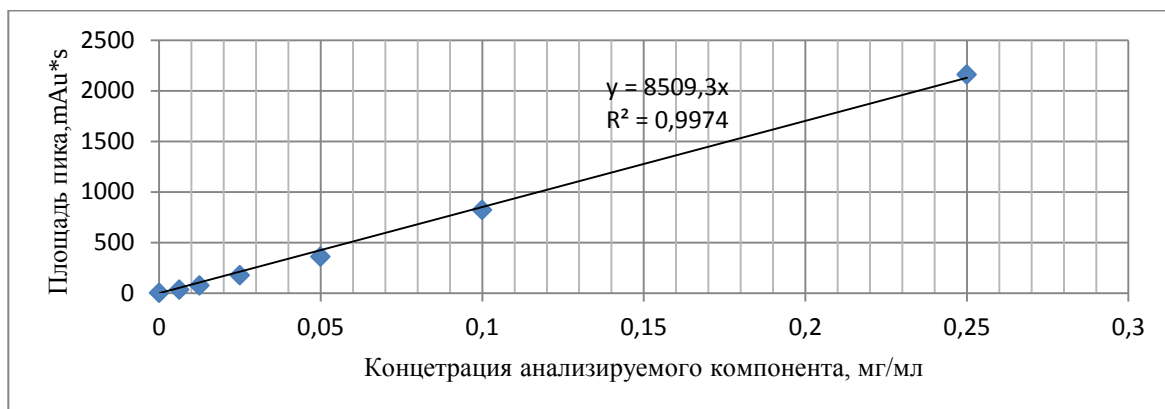


Рисунок 12 – Градуировочная кривая стандартных растворов B₁₂

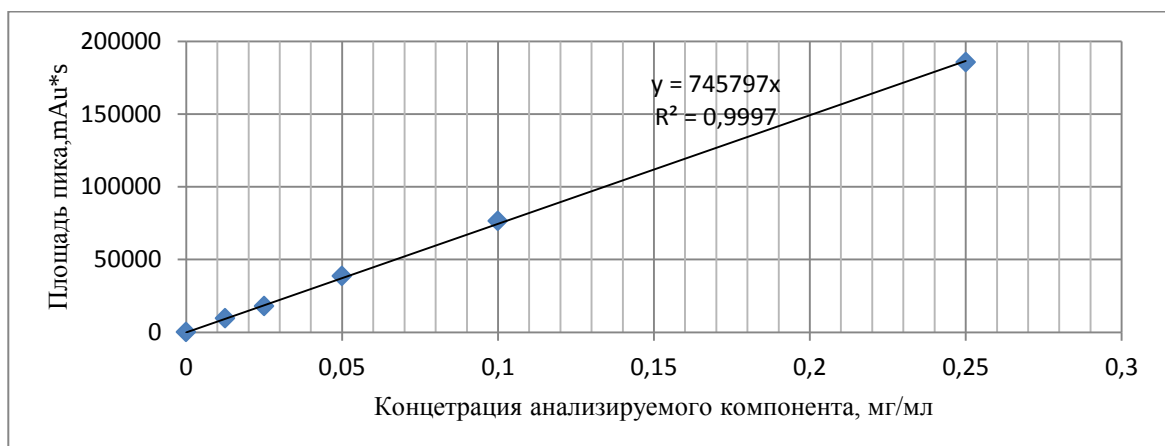


Рисунок 13 – Градуировочная кривая стандартных растворов B₁

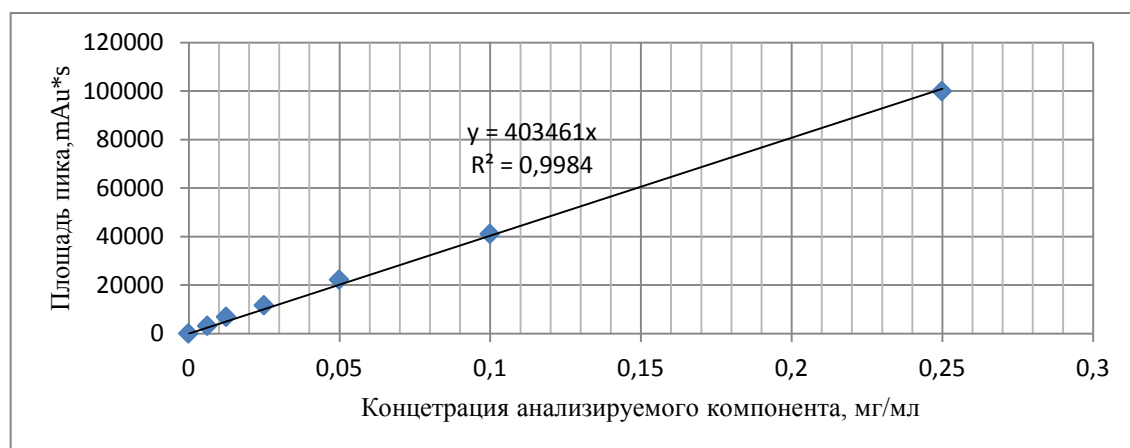


Рисунок 14 – Градуировочная кривая стандартных растворов B₆

В таблицах 2-4 показаны результаты наших образцов, и можно сказать, что содержание витаминов соответствуют нормам.

Таблица 2 – Результаты анализа образцов с витамином В₁

Образец	Vпробы, мл	Масса навес- ки, г	В ₁ мг/мл	В ₁ мг/100г	Нормирован- ное содержание, мг/100г продукта
Малютка (сух.смесь)	100	0,1	0,0467	0,467	429,3мкг= 0,4293мг
Грудное молоко	50	0,1	0,0088	0,088	92мкг= 0,092мг
Витамишки (жевательные пастилки)	100	0,1	0,005	0,05	-
Nestle (сух.каша)	100	0,1	0,0098	0,098	0,13
Компливит (таблетидная форма)	100	0,1	0,013	0,13	1

Таблица 3 – Результаты анализа образцов с витамином В₁₂

Образец	Vпробы,	Масса	В ₁₂	В ₁₂	Нормир
---------	---------	-------	-----------------	-----------------	--------

	мл	навес- ки, г	мг/мл	мг/100г	ован-ное содержа ние, мг/100г продукт а
Малютка (сух.смесь)	100	0,1	0,000085	0,0085	1.1мкг= 0,0011
Грудное молоко	50	0,1	0,0105	0,105	116мкг= 0,116
Витамишки (жевательные пастилки)	100	0,1	0,00018	0,0018	2мкг=0, 002
Nestle (сух.каша)	100	0,1	0,065	0,65	-
Компливит (таблетвидная форма)	100	0,1	0,00095	0,0095	12.5 мкг= 0,012

Таблица 4 – Результаты анализа образцов с витамином В₆

Образец	Vпробы,	Масса	В ₆	В ₆	Нормиров
---------	---------	-------	----------------	----------------	----------

	мл	навес- ки, г	мг/мл	мг/100г	ан-ное содержани е, мг/100г продукта
Малютка (сух.смесь)	100	0,1	0,0203	0,203	288 мкг = 0,288
Грудное молоко	50	0,1	0,0032	0,03	55 мкг = 0,055
Витамишки (жевательные пастилки)	100	0,1	0,0000 36	0,00036	0,4 мкг = 0,0004
Nestle (сух.каша)	100	0,1	0,0071	0,071	0,08
Компливит (таблетвидная форма)	100	0,1	0,38	3,8	5

Таким образом, гидрофильная жидкостная хроматография может быть рекомендована для разделения и определения витаминов группы В в различных объектах. Причем разделение данных веществ происходит в условиях изократического элюирования, что также является более оптимальным с точки зрения экономической выгоды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из анализа литературных данных показаны возможности ВЭЖХ в контроле фармпрепаратов, в частности, возможности ее гидрофильного режима. Проанализированы особенности строения, химические свойства и биологические роли тиамин (B_1), пиридоксин (B_6) и цианокобаламина (B_{12}).

Подобраны оптимальная хроматографическая система и условия для проведения исследования витаминов группы В в условиях гидрофильной ВЭЖХ. Проведен анализ некоторых образцов продуктов питания и ЛП, содержащих в своем составе комплекс витаминов.

С помощью метода абсолютной градуировки определены концентрации витаминов. По полученным данным сделан вывод, что содержание витаминов соответствуют нормам.

Низкое содержание витамина B_1 оказалось в грудном молоке, а наибольшее в «Компливит». B_{12} с наименьшим содержанием в «Малютка», а в «Nestle» с большей концентрацией. Витамин B_6 с наименьшей концентрацией содержался в «Витамишки», с наибольшей в «Компливит».

Режим гидрофильной хроматографии в анализе витаминов группы В является весьма перспективной альтернативой методу ОФ ВЭЖХ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березов.Т.Т. // Биологическая химия: Учебник.–3- е изд., перераб.и доп. М.: Медицина,1998. 704 с.
2. Березовский В.М. // Химия витаминов. М.: Пищпромиздат, 1959. 600 с.
3. Овчинников Ю.А. // Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 816 с.
4. Смирнов В.А., Климочкин Ю.Н. // Витамины и коферменты: учеб. пособ. Ч. 2 / В.А. Смирнов, Ю.Н. Климоч-кин. – Самара: Самар. гос. техн. ун -т. 2014. 91 с.
5. Melinda M. Manore // International Journal of Sport Nutrition. 1994. Vol.4. No. 2. P. 89-103.
6. Herman C. Lichstein, I. C. Gunsalus, and W. W. Umbreit //J. Biol. Chem. 1945. 311-32 p.
7. M. D. Mostaqul Huq, Nien-Pei Tsai, Ya-Ping Lin, LeeAnn Higgins & Li-Na Wei // Nature Chemical Biology. 2007. Vol.3. 161-165 p.
8. Reem Malouf, John Grimley Evans // J. Vitamin B6 for cognition. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2003. Vol. 4. No. :CD004393. 22p.
9. J.-H. Martens · H. Barg · M.J. Warren · D. Jahn // Applied Microbiology and Biotechnology. 2002. Vol. 58, No. 3, p. 275–285.
10. Baik HW, Russell RM. // Annual Review of Nutrition. 1999. Vol. 19. P. 357-377.
11. Улахонович. Н. А. // Соросовский образовательный журнал. 1997. №8. 27-32с.
12. Albert Eschenmoser // Angewandte Chemie International Edition. 1998. Vol. 27, No. 1, p. 5–39.
13. Kelleher BP, Broin SD. // J Clin Pathol 1991. Vol 44. No.7. p. 592-595.

14. Blake, C.J. Anal Bioanal Chem // Analytical, Bioanalytical Chemistry. 2007. Vol. 389. No. 1. P. 63–76.
15. Е.М. Рахманько, Е.И. Полянских, О.В. Шуляковская // Вестник БГУ. Журнал. 2012. №2.
16. Jesse F. Gregory, III and Debra Feldstein // Agric. Food Chem. Vol. 33. No. 3, 1985. p. 359-363.
17. Jung-Hoon Lee Jin-Ho Shin Jung-Min Park Ha-Jung Kim Jang-Hyuk Ahn Byung-Man Kwak, Jin-Man Kim // Korean J. Food Sci. An. 2015. Vol. 35. No. 6, p. 765-771.
18. В.М. Коденцова, О.А. Вржесинская // Вопросы питания. 2008. Том 77. № 4.
19. Mann D.L, Ware GM, Bonnin E, Eitenmiller R.R. // African Journal of Microbiology Research. 2013. Vol. 7. № 27. pp. 3489-3493.
20. Шелеметьева О.В. // Автореферат. 2009. 138с.
21. S. Boonkerd, M.R. Detaevernier, Y. Michotte // J. Chromatogr. A. Vol. 670. 1994. p. 209-214.
22. Ivanović D, Popović A, Radulović D, Medenica M. // J. Pharm Biomed Anal. 1999. Vol. 18. No. 6. p. 999-1004.
23. Hua-Bin Li, Feng Chen // Fresenius J. Anal.Chem. 2000. Vol. 368, No. 8. p. 836–838.
24. Clara A. Storvick, Jean Mc. Leod Peters // Vitamins and hormones. 1964. Vol. 22. p. 833-854.
25. David A. Sampson, Ph.D., Dennis K. O'Connor, A.B. // Nutrition Research. Vol. 9, No. 3. 1989. P. 259-272.
26. Ren XN, Yin SA, Yang ZY, Yang XG, Shao B, Ren YP, Zhang J. // Biomed Environ Sci. 2015. Vol. 28. No. 10. p. 738-50.
27. Thomas MR, Sneed SM, Wei C, Nail PA, Wilson M, Sprinkle EE 3rd. // Am J Clin Nutr. 1980. Vol. 33. No. 10. p. 2151-2156.

28. Kathleen L. Deegan, Katherine M. Jones, Clara Zuleta, Manuel Ramirez-Zea, Dorte L. Lildballe, Ebba Nexo, Lindsay H. Allen // *Journal of Nutrition*. Vol. 23. No. 1. 2011. p. 5.
29. B. L. Specker, A. Black, L. Allen, and F. Morrow // *J. Clin Nutr.* 1990. Vol. 52. No. 6. p. 1073-1076.
30. Lindsay H. Allen // *J. Adv. Nutr.* 2012. Vol. 3. p. 362-369.
31. Каримова Ш.Ф., Юлдашев Н.М., Исмаилова Г.О., Нишант аев М.К. // *Журн. успехи совр. естеств.-я.* 2015. Выпуск 9. Часть 3. с. 422-428.
32. Елисеев Е.В., Кокорева Е.Г., Рыжков Р. Е. // *Здравоохранение, образование и безопасность.* 2015. Выпуск 2. с. 7-11.
33. Слепченко Г.Б., Мартынюк О.А., Шелеметьева О.В. // *Журн. Известия Томского политехнического университета.* 2008. Т. 312. № 3. С. 58-61.
34. Safwan Ashour, M. Fawaz Chehna, Roula Bayram // *Int. J. Biomed Sci.* 2006. Vol. 2. No.3. p. 273–278.
35. P. Ortega-Barrales, M.L. Fernández-de Córdova , A. Molina-Díaz // *Analytica Chimica Acta.* 1998, Vol. 70. No.2. p. 271–275.
36. P. Ortega Barrales, M.L. FernaÂndez de CoÂrdova, A. Molina DõÂaz // *Analytica Chimica Acta.* 1998. Vol.376. p.227-233.
37. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. // *Хроматографические методы анализа. Методическое пособие для специального курса.* Москва, 2007. с. 211.
38. Бёккер Ю. // *Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза.* Москва: Техносфера, 2009. С.472.
39. Alberto Zafra-Gómez , Antonio Garballo , Juan C. Morales , Luis E. García-Ayuso // *J. Agric. Food Chem.* 2006. Vol. 54. No.13. p.4531–4536.

40. О. В. Чечета, Елена Федоровна Сафонова, Алексей Иванович Сливкин, Г. А. Оголь // Химико-фармацевтический журнал. Т.42. № 12. 2008. с. 47-49.
41. Babak Basiri, James Michael Sutton, Bradley S. Hanberry, Jason A. Zastre, Michael G. Bartlett // Biomed. Chromatogr. 2016; Vol. 30. No.1. p. 35–41.
42. Rouhollah Heydari, Najmeh S. Elyasi // J. Sep. Sci. 2014. Vol. 37. p. 2724–2731
43. Emiko Morita., Nobuyasu Mizuno // Journal of Chromatography A. Vol. 202, No. 1. 1980. P.134-138.
44. C.K. Markopoulou, K.A. Kagkadi, J.E. Koundourellis // J. Pharm. Biomed. Anal. Vol.30. 2002. P.1403-1410.
45. F. Arella, S. Lahkly, J. B. Bourguignon, C. Hasselman // Food Chemistry.Vol. 56. No. 1. 1996. P. 81-86.
46. И.Н. Дмитриевич, Г.Ф. Пругло, О.В. Фёдорова, А.А. Комиссаренков // Хроматографические методы анализа. Часть III. Санкт-Петербург, 2014.
47. Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде. // Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. Производственное издание. Москва. 1986. с.213.
48. C.M. Karrunakaran, S. Poongothai // Int. J. Pharm Pharm Sci. 2010. Vol. 2. No. 4. P.133-139.
49. Nicholas A. Cellar, Sean C. McClure, Louis M. Salvati, Todime M. Reddy // Analytica Chimica Acta. Vol. 934. 2016. P. 1-6.
50. E. E. Abano, Rosemond Godbless Dadzie // Croat. J. Food Sci. Technol. 2014. Vol. 6. No.2. p.116-123.
51. С. Ю. Гармонов, И. А. Салахов, Г. Р. Нурисламова, Р. Н. Исмаилова, Э. А. Иртуганова, В. Ф. Сопин // Химико-фармацевтический журнал. Т.45. № 7. 2011. с. 48-51.

52. Monir Amin, Joachim Reusch // J. Analyst. 1987. Vol. 112. P.989-991.
53. P. Moreno, V. Salvado // J. Chromatogr. A. 2000. Vol. 870. P. 207–215.
54. Bogusław Buszewski, Sylwia Noga // J. Anal.Bioanal Chem. 2012. Vol. 402. No.1. p. 231–247.
55. Бендрышев А. А., Пашкова Е.Б., Пирогов А. В., Шпигун О.А. // Жур. Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2: химия. 2010. С.315-324.
56. Salvati LM1, McClure SC, Reddy TM, Cellar NA. // J. AOAC Int. 2016. Vol. 99. No.3. p.776-85.