

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ рН РОЗЧИННИКА НА КОРОТКОТРИВАЛУ СТАБІЛЬНІСТЬ ВОДОРозчинНИХ ВІТАМІНІВ У РОЗЧИНІ

*Р. Д. Остапів, канд. біол. наук,
В. І. Ткаченко, канд. біол. наук*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна
romostapiv@scivp.lviv.ua

Метою роботи було дослідити вплив рН на короткочасну стабільність як окремих водорозчинних вітамінів, так і їх сумішей, характеризуючи тим самим робастність методу відносно рН розчинника, як одного з параметрів валідації методу. Визначання концентрації вітамінів проводили рідинно-хроматографічним методом безпосередньо після їх розчинення, а також після витримки впродовж 1, 2 та 3 годин за температури 20 °С. Аналіз виконано на рідинному хроматографі фірми Waters, оснащеному сепараційним модулем Alliance 2690 з діодноматричним детектором PAD 996. Умови розділення зразків: хроматографічна колонка Luna Omega Polar C18 250 × 4,6 мм, 5 μм. Рухома фаза: суміш ацетонітрилу з 0,05 М фосфатним буферним розчином, рН 3,0. Для розділення тіаміну гідрохлориду, нікотинаміду, піридоксину гідрохлориду та кислоти аскорбінової (I група вітамінів) співвідношення компонентів становило 3:97, для розділення аскорбінової кислоти, рибофлавіну та ціанокобаламіну (II група вітамінів) – 15:85. Об'єм інжекції складав 0,01 мл, швидкість потоку рухомої фази – 1,0 мл/хв, температура колонки становила 25 °С, час одного розділення – 10 хвилин. Довжина хвилі детекції – 265 нм.

Виявлено, що зменшення концентрації вітамінів В₁, В₂, В₆, В₁₂ та нікотинаміду у сумішах з кислотою аскорбіновою знаходиться в межах 10% за усіх значень рН, крім 9,0. За цього рН концентрація вітаміну В₁ у сумішах з вітамінами В₆, С та нікотинамідом зменшується на 38%. Найчутливішим до рН виявився вітамін С. Так, найбільше зниження концентрації кислоти аскорбінової було зареєстроване за використання фосфатного буферу з рН 5,0 та 7,0, як у I групі вітамінів, так і коли вітамін С був наявний у розчині без інших вітамінів. За рН 9,0 концентрація кислоти аскорбінової зменшувалась в межах 50-80%. Найстабільнішою кислотою аскорбіновою була за використання розчиннику з рН 3,0, який і пропонується використовувати для подальшої валідації методики визначання водорозчинних вітамінів у преміксах та кормових добавках.

Ключові слова: ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ВОДОРозчинні ВІТАМІНИ, СТАБІЛЬНІСТЬ У РОЗЧИНАХ, ВПЛИВ рН.

INVESTIGATION OF THE SOLVENT pH EFFECT ON SHORT-TERM STABILITY OF WATER-SOLUBLE VITAMINS IN SOLUTION

R. D. Ostapiv, V. I. Tkachenko

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine
romostapiv@scivp.lviv.ua

The aim of this work was to investigate the effect of pH on the short-term stability of both individual water-soluble vitamins and their mixtures, thus characterizing the robustness of the method

in relation to the pH of the solvent as one of the validation method parameters. Determination of vitamin concentration was performed by liquid chromatographic method immediately after their dissolution, as well as after exposure for 1, 2 and 3 hours at a temperature of 20°C. The analysis was performed on a Waters liquid chromatograph equipped with an Alliance 2690 separation module with a PAD 996 diode array detector. Sample separation conditions: Luna Omega Polar C18 250 × 4.6 mm, 5 µm chromatographic column. Mobile phase: a mixture of acetonitrile with 0.05 M phosphate buffer solution, pH 3.0. For the separation of thiamine hydrochloride, nicotinamide, pyridoxine hydrochloride and ascorbic acid (vitamin group I), the ratio of components was 3:97, for the separation of ascorbic acid, riboflavin and cyanocobalamin (vitamin group II) - 15:85. The injection volume was 0.01 ml, the mobile phase flow rate was 1.0 ml/min, the column temperature was 25°C, and the separation time was 10 minutes. The detection wavelength is 265 nm.

It was found that the decrease in the concentration of vitamins B₁, B₂, B₆, B₁₂ and nicotinamide in mixtures with ascorbic acid was within 10% at all pH values except 9.0. When buffer with this pH was used, the concentration of vitamin B₁ decreased by 38 % in mixtures with vitamins B₆, C and nicotinamide. Vitamin C was the most sensitive to pH. Thus, the greatest decrease in the concentration of ascorbic acid was recorded with the use of phosphate buffer with pH 5.0 and 7.0, both in group I vitamins and when vitamin C was present in solution without other vitamins. At pH 9.0, the concentration of ascorbic acid decreased in the range of 50-80 %. Ascorbic acid was stable when solvent with a pH of 3.0 was used. This solvent is proposed to be used for further validation of methods for determining water-soluble vitamins in premixes and feed additives.

Keywords: HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, WATER-SOLUBLE VITAMINS, STABILITY IN SOLUTIONS, pH EFFECT.

Валідація аналітичних методів випробувань – експериментальний доказ того, що метод придатний для кількісного та якісного аналізу певних речовин, які визначаються у досліджуваній матриці (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0., 2015). Однією з процедур валідації є визначення робастності, тобто дослідження впливу різних факторів на результат випробування. Одним з таких факторів є стабільність речовини, що визначається, у розчинах (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0., 2015). При проведенні аналізу вітамінів, стабільність у розчинах є надзвичайно важливим параметром валідації, оскільки для кожного вітаміну є своє оптимальне значення рН розчинника, за якого речовина є стабільною (Park et al., 2016). У лабораторії вискоєфективної рідинної хроматографії ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок розроблено метод розділення одинадцяти водорозчинних вітамінів (Ostapiv & Tkachenko, 2020). Однак, в ході експериментів було виявлено, що площа хроматографічного піку вітаміну С з часом зменшується за використання води як розчинника. Окрім цього, відомо, що концентрація ціанокобаламіну в розчині зменшується за наявності аскорбінової кислоти (Vajaj & Singhal, 2020), що ускладнює їх одночасне визначання у розчинах та преміксах. Тому метою даної роботи було дослідити вплив рН на короточасну стабільність як окремих водорозчинних вітамінів, так і їх суміші, характеризуючи тим самим робастність методу відносно рН розчинника, як одного з параметрів валідації методу.

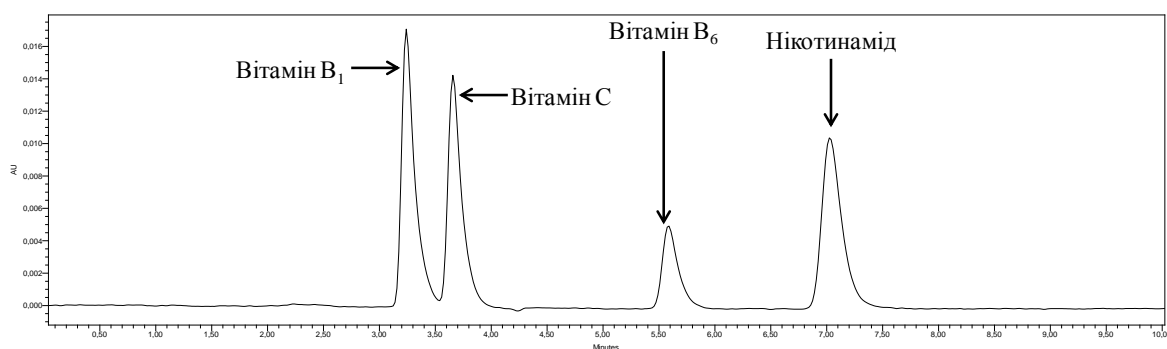
Матеріали і методи. У роботі використовували сертифіковані стандартні зразки вітамінів (тіаміну гідрохлориду, нікотинаміду, піридоксину гідрохлориду, кислоти аскорбінової, рибофлавіну та ціанокобаламіну) виробництва Sigma-Aldrich. Основні розчини кожного вітаміну з концентрацією 100 мкг/мл готували з урахуванням чистоти зразка, зазначеної у сертифікаті якості, шляхом розчинення у 0,05 М фосфатних буферних розчинах, до титрованих до різного значення рН (3,0; 5,0; 7,0; 9,0) 1 М гідроксидом натрію. Після цього основні розчини вітамінів розводили тими самими розчинниками до потрібних концентрацій робочих розчинів (10–20 мкг/мл).

Визначення концентрації вітамінів проводили рідинно-хроматографічним методом безпосередньо після їх розчинення, а також після витримки впродовж 1, 2 та 3 годин за

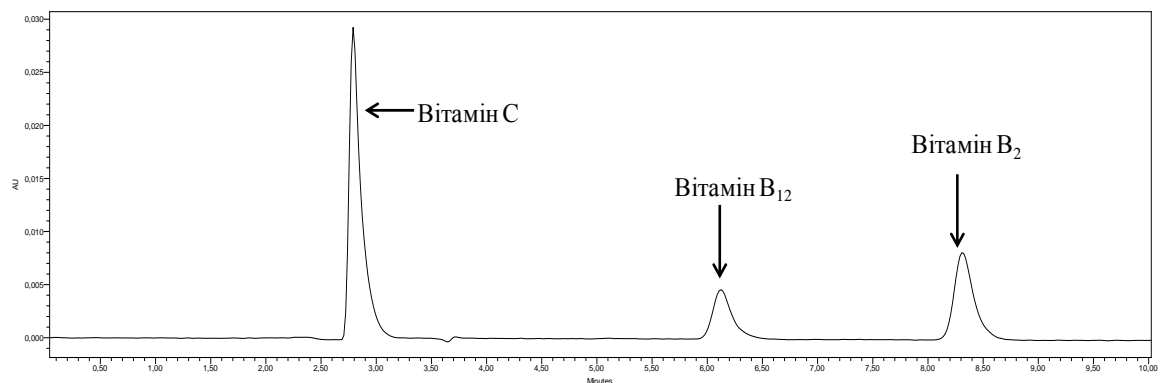
температури 20 °С. Аналіз виконано на рідинному хроматографі фірми Waters, оснащеному сепараційним модулем Alliance 2690 з діодноматричним детектором PAD 996. Умови розділення зразків: хроматографічна колонка Luna Omega Polar C18 250 × 4,6 мм, 5 μм. Рухома фаза: суміш ацетонітрилу з 0,05 М фосфатним буферним розчином, рН 3,0. Для розділення тіаміну гідрохлориду, нікотинаміду, піридоксину гідрохлориду та кислоти аскорбінової (I група вітамінів) співвідношення компонентів становило 3:97, для розділення аскорбінової кислоти, рибофлавіну та ціанокобаламіну (II група вітамінів) – 15:85. Об'єм інжекції складав 0,01 мл, швидкість потоку рухомої фази – 1,0 мл/хв, температура колонки становила 25 °С, час одного розділення – 10 хвилин. Довжина хвилі детекції – 265 нм (Ostapiv R.D., Tkachenko V.I., 2020).

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel (Derzhavna farmakopeia Ukrainy, 2004).

Результати й обговорення. Хроматограми розчинів суміші стандартних зразків вітамінів групи I та II представлені на рисунку.



А



Б

Рис. Хроматограми стандартних розчинів вітамінів групи I (А) та II (Б)

В результаті дослідження короткочасної стабільності вітамінів I групи, яку розчиняли у 0,05 М фосфатному буфері з рН 3,0 виявлено, що усі вітаміни стабільні впродовж години (табл. 1). За 3 години спостерігається зменшення концентрації вітаміну С на 11,5 %. При цьому вітаміни В₁, В₆ та нікотинамід були стабільними і через три години експерименту.

За використання розчинника з рН 5,0 кількість вітаміну С у розчині зменшувалась вдвічі вже після першої години експерименту. За три години експерименту вітаміну С залишалось менше 5 % від початкової концентрації. Вміст інших вітамінів у досліджуваному розчині незначно знижувався (до 3 %) за три години експерименту.

Стабільність суміші вітамінів В₁, В₆, С та нікотинамід у розчині за різного рН розчинника

Час після розчинення, год	Виявлена концентрація вітамінів, % від початкової			
	Вітамін В ₁	Вітамін В ₆	Вітамін С	Нікотинамід
рН 3,0				
0	100,00±0,63	100,00±0,45	100,00±0,65	100,00±0,26
1	100,39±0,77	100,93±0,46	97,24±0,90	100,16±0,32
2	99,98±0,78	101,43±0,92	93,91±0,34	99,81±0,40
3	100,09±0,87	101,44±1,08	88,53±0,50	99,79±0,53
рН 5,0				
0	100,00±1,14	100,00±1,79	100,00±1,81	100,00±1,38
1	100,28±0,82	96,77±0,94	44,01±2,91	100,21±0,53
2	98,88±0,94	95,33±1,56	17,31±1,21	99,14±1,47
3	97,55±1,21	94,19±1,70	4,78±0,68	97,36±1,53
рН 7,0				
0	100,00±0,47	100,00±1,46	100,00±4,82	100,00±0,59
1	101,74±0,38	99,90±1,15	38,79±0,59	100,26±0,27
2	102,47±0,47	97,47±0,81	13,47±0,62	99,69±0,19
3	101,85±0,47	94,79±2,15	5,12±0,22	99,37±0,37
рН 9,0				
0	100,00±0,82	100,00±0,26	100,00±4,68	100,00±0,51
1	83,72±0,86	101,23±0,21	64,04±1,05	99,86±0,70
2	68,17±0,91	99,21±0,19	48,03±0,39	100,52±0,77
3	61,99±0,93	99,01±0,40	16,05±0,23	99,03±0,89

Коли суміш вітамінів розчиняли 0,05 М буферним розчином з рН 7,0 концентрація вітаміну С зменшувалась на 61,21 % вже після першої години витримки. При цьому, концентрація вітаміну В₁ та нікотинамід залишалась незмінною впродовж 3-х годин, а вітаміну В₆ незначно зменшувалась (менше 6 %).

За використання розчинника з рН 9,0 вміст вітаміну С зменшувався на 35,96 %, а вітаміну В₁ – на 16,28 % після першої години експерименту. Після третьої години вміст вітаміну С був на 83,95 % меншим, порівняно з першими ін'єкціями, а вітаміну В₁ – на 38,01 %. Нікотинамід та вітамін В₆ за рН 9,0 були стабільними.

Під час досліджень стабільності вітамінів II групи, які розчиняли за рН 3,0, зареєстровано, що вміст цих вітамінів залишається незмінним впродовж години (табл. 2). Через дві години вміст вітаміну С у розчині зменшувався на 5 %, через 3 години – на 11,65 %. Отже, як в I, так і в II групі вітамінів, концентрація аскорбінової кислоти за рН 3,0 зменшувалась на приблизно однакову величину через три години експерименту.

За значення рН 5,0 вітаміни В₂ та В₁₂ були стабільними впродовж усього експерименту. Концентрація вітаміну С зменшувалась на 12 % вже через годину експерименту і досягала найнижчого значення – 60,27 % від початкового значення за три години експерименту.

Вітаміни В₂ та В₁₂ є стабільними впродовж трьох годин за рН 7,0 та 9,0. Концентрація вітаміну С зменшується до 80,61% та до 26,36 % за рН 7,0 і рН 9,0, відповідно. Зменшення вмісту аскорбінової кислоти у розчині з рН 7,0 є суттєвішим у суміші з вітамінами В₁, В₆, та нікотинамідом, ніж у суміші з В₂, та В₁₂, що може бути пояснене антиоксидантними властивостями ціанокобаламіну та рибофлавіну (Asplund, 2002).

Оскільки є різниця між інтенсивністю зменшення концентрації аскорбінової кислоти у сумішах з різними вітамінами групи В, то імовірно, що вони по різному можуть впливати на стабільність вітаміну С у розчині. Тому було досліджено вплив рН на стабільність вітаміну С у розчинах за відсутності інших вітамінів. Виявлено, що за рН 3,0 аскорбінова кислота стабільна впродовж трьох годин, і її вміст через три години експерименту складав 97,8 % від початкового (табл. 3).

Таблиця 2

Стабільність вітамінів В₂, В₁₂ та С у суміші за різного значення рН розчинника

Час після розчинення, год	Виявлена концентрація вітамінів, % від початкової		
	Вітамін В ₂	Вітамін В ₁₂	Вітамін С
	рН 3,0		
0	100,00±0,22	100,00±0,63	100,00±0,65
1	100,07±0,58	99,61±0,14	97,89±0,40
2	100,18±1,53	99,66±0,80	94,94±0,94
3	96,97±1,25	96,31±0,75	89,35±0,55
	рН 5,0		
0	100,00±0,47	100,00±0,85	100,00±2,57
1	99,52±1,05	100,22±0,43	87,83±0,64
2	99,80±2,59	100,48±0,88	73,57±1,45
3	97,06±2,20	99,63±1,45	60,27±1,02
	рН 7,0		
0	100,00±0,68	100,00±0,30	100,00±0,48
1	100,15±1,79	99,16±0,50	94,09±0,10
2	98,73±1,21	99,13±0,60	87,30±0,26
3	98,54±1,54	99,02±0,90	80,61±0,68
	рН 9,0		
0	100,00±0,57	100,00±0,76	100,00±6,67
1	99,74±1,01	99,55±0,50	64,69±1,51
2	99,31±0,94	99,32±0,65	40,89±1,10
3	98,37±0,38	100,21±0,26	26,35±0,86

Таблиця 3

Стабільність вітаміну С у розчинах з різним значенням рН

Час після розчинення, год	Виявлена концентрація вітаміну С, % від початкової			
	рН 3,0	рН 5,0	рН 7,0	рН 9,0
0	100,00±0,43	100,00±0,31	100,00±1,76	100,00±10,67
1	100,93±1,04	45,50±0,42	65,93±2,47	76,15±8,90
2	99,52±0,46	33,99±1,42	47,88±5,43	71,77±1,86
3	97,08±0,24	6,18±0,25	33,09±5,45	62,76±4,85

За показника рН 5,0, вміст аскорбінової кислоти за годину зменшувався на 54,5%, порівняно з початком експерименту, а за три години вміст становив 6,18 %, від початкового. Менш стрімке падіння концентрації вітаміну С виявлено за рН 7,0 у порівнянні із розчином аскорбінової кислоти із рН 5,0, де через три години експерименту залишалось 33,09%. За рН 9,0 на кінець експерименту залишилось 62,8 % вітаміну С від початкової кількості.

Серія досліджень залежності зміни концентрації вітамінів у часі від різних значень рН дозволяє зробити висновки, що за рН 3,0 досліджувані вітаміни стабільні впродовж трьох годин. При цьому, аскорбінова кислота стабільніша в розчині без інших вітамінів, як за рН 3,0 так і за рН 9,0. У суміші з вітамінами групи В, аскорбінова кислота може діяти як антиоксидант, стабілізуючи їх у розчині (Asplund, 2002). За рН 5,0 концентрація вітаміну С зменшується до приблизно 5 % впродовж трьох годин досліду, як в суміші з вітамінами В₁, В₆ та нікотинамідом, так і за відсутності у розчині інших вітамінів. Однак, у суміші з вітамінами В₂ та В₁₂ за рН 5,0 вміст аскорбінової кислоти зменшується всього на 40 % впродовж трьох годин, що може свідчити про антиоксидантний вплив на вітамін С, або рибофлавіну, або ціанокобаламіну (Asplund, 2002). Тому, серед досліджених розчинів оптимальним можна вважати розчин із рН 3,0, у якому концентрація усіх доданих вітамінів впродовж експерименту зберігалась на досить високому рівні (більше 89 %).

ВИСНОВКИ

Визначено оптимальне рН розчинника, за якого вміст водорозчинних вітамінів змінюється найменше. Встановлено, що вітаміни В₁, В₆ та нікотинамід у суміші з аскорбіною кислотою стабільні впродовж трьох годин за рН 3,0–7,0. Вітаміни В₂ та В₁₂ у суміші з вітаміном С стабільні впродовж трьох годин за всіх значень рН. Аскорбінова кислота стабільна тільки за значення рН 3,0. Виявлено, що присутність вітамінів В₂ та В₁₂ підтримує стабільність аскорбінової кислоти за рН 5,0 та 7,0, а наявність вітамінів В₁, В₆ та нікотинамід, навпаки зменшують її за рН 7,0 та 9,0.

Перспективи досліджень. Продовження валідації методики визначання водорозчинних вітамінів у різних матрицях, зокрема у пероральних та ін'єкційних розчинах, преміксах та кормах.

References

- Asplund, K. (2002). Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Journal of Internal Medicine*. 251: 372–392. DOI: 10.1046/j.1365 2796. 00973.x
- Bajaj, S.R. & Singhal, R.S. (2020). Degradation kinetics of vitamin B₁₂ in model systems at different pH and extrapolation to carrot and lime juices. *Journal of Food Engineering*. 272: 1–27. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109800
- Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr» Kharkiv: RIREH, 2015. 1. 1226. [In Ukrainian].
- Ostapiv, R.D. & Tkachenko, V.I. (2020). Optymizatsiia umov ridynno-khromatohrafichnoho rozdilennia vodorozchynnykh vitaminiv Naukovo-tekhnichnyi biuleten Derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrolnoho vetpreparativ ta kormovykh dobavok i Instytutu biolohii tvaryn. 21,1: 141–147. [In Ukrainian]. DOI:10.36359/scivp.2020-21-1.18.
- Park, J., Kim, K., Choi, Y., Park, Y., Kwon, H. (2016). The stability of water- and fat-soluble vitamin in dentifrices according to pH level and storage type. *Biomedical Chromatography*. 30: 191–9. DOI: 10.1002/bmc.3535]
- Rychlik, M., editor. (2011). *Fortified Foods with Vitamins: Analytical Concepts to Assure Better and Safer Products*. New York: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 292.
- Statystychnyi analiz rezultativ khimichnoho eksperymentu Derzhavna farmakopeia Ukrainy. Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr». Kharkiv: RIREH. Dopovnennia 1. 2004. 196–198. [In Ukrainian].