ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ РІДИННО-ХРОМАТОГРАФІЧНОГО РОЗДІЛЕННЯ ВОДОРОЗЧИННИХ ВІТАМІНІВ

*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

Вітаміни широко застосовуються у ветеринарній медицині, зокрема, як компоненти преміксів, кормів та кормових добавок для підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин. При цьому, більшість таких кормових добавок являють собою складну амінокислотно-вітамінну суміш (з десяти діючих речовин та більше) на основі матриці рослинного чи тваринного походження, які ще можуть збагачуватись білком. Коли перед аналітиком ставиться складне завдання проаналізувати таку суміш, то зазвичай, доводиться застосовувати кілька варіантів методу ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія), що збільшує час та вартість аналізу преміксу, чи кормової добавки.

Метою цієї роботи було оптимізувати методику аналізу рибофлавіну в преміксах та кормових добавках для одночасного (впродовж одного хроматографічного розділення) визначення вмісту максимальної кількості водорозчинних вітамінів.

Для розділення використали рідинний хроматограф фірми Waters, оснащений сепараційним модулем Alliance 2690 з діодноматричним детектором PAD 996. Водорозчинні вітаміни розділяли на хроматографічній колонці Luna Omega Polar C18 250 × 4,6 мм, 5 μм. Як розчинник використовували 0,05 М фосфатний буфер з рН 3,0 та 0,1 М розчин натрію гідрооксиду (для фолієвої кислоти).

У статті описано етапи оптимізації параметрів рідинно-хроматографічного розділення дванадцяти вітамінів та вітаміноподібних речовин (тіаміну гідрохлориду, рибофлавіну, флавінмононуклеотид фосфату, нікотинової кислоти, нікотинамід, пантотенату кальцію, піридоксину гідрохлориду, аскорбінової кислоти, менадіону, ціанокобаламіну, фолієвої кислоти та біотину). Подані хроматограми розчинів стандартних зразків, які показують специфічність методики. Досліджено ізократичну та градієнтну схеми елювання. Оцінено деякі параметри хроматографічних піків за умов градієнтного розділення вітамінів. Параметри хроматографічних піків не виходять за межі, рекомендовані у Державній фармакопеї України (ДФУ 2.0), що дозволить у подальшому здійснити більш повну валідацію методики для кількісного визначення водорозчинних вітамінів у різноманітних складних матрицях: ін'єкційних та пероральних розчинах, кормах та преміксах.

Ключові слова: ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ВОДОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ, ПРЕМІКСИ, КОРМОВІ ДОБАВКИ.

OPTIMIZATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS TO SEPARATE WATER-SOLUBLE VITAMINS

R. D. Ostapiv, V. I. Tkachenko

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

Vitamins are widely used in veterinary medicine, in particular, as components of premixes, feeds and feed additives to increase the productivity of farm animals. Most of these feed additives are a complex amino acid and vitamin mixtures (of ten active substances or more) based on the matrix of plant or animal origin, which can be enriched with protein. When the analyst is faced with the difficult task of analyzing such a mixture, it is usually necessary to use several variants of the HPLC method (high-performance liquid chromatography), which increases the time and cost of analysis of the premix or feed additive. The aim of this work was to optimize the validated method of analysis of riboflavin in premixes and feed additives available in the laboratory for simultaneous (during one chromatographic separation) determination of the content of the maximum amount of water-soluble vitamins. A Waters liquid chromatograph equipped with an Alliance 2690 separation module with a PAD 996 diode array detector was used for separation. Water-soluble vitamins were separated on a Luna Omega Polar C18 250 × 4.6 mm, 5 μm chromatographic column. As solvents were used 0.05 M phosphate buffer pH 3.0 and 0.1 M sodium hydroxide solution (for folic acid).

The article describes the stages of liquid chromatographic separation parameters optimization of twelve vitamins and vitamin-like substances (thiamine hydrochloride, riboflavin, flavin mononucleotide phosphate, nicotinic acid, nicotinamide, calcium pantothenate, phosidinobacino acidorinolobin, hydrocyanide). Chromatograms of standard samples solutions are given, which show the specificity of the technique. Isocratic and gradient elution schemes are investigated. Some parameters of chromatographic peaks under conditions of gradient separation of vitamins are estimated. The parameters of the chromatographic peaks do not exceed the limits recommended in the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU 2.0), that will allow to further carry out a more complete validation of the method for quantitative determination of water-soluble vitamins in various complex matrices: injection and oral solutions, feeds and premixes.

Keywords: HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, WATER-SOLUBLE VITAMINS, PREMIXES, FEED ADDITIVES.

Вітаміни – низькомолекулярні органічні сполуки різної хімічної природи, що необхідні для життєдіяльності живого організму в малих дозах, і не утворюються в самому цьому організмі в достатній кількості, через що повинні надходити із їжею (Nelson & Cox, 2011). У ветеринарії вони застосовуються як важливі компоненти ін'єкційних та пероральних розчинів, преміксів та кормів, для лікування або збільшення продуктивності тварин: ВРХ, свиней та птиці. Кількість таких ветеринарних препаратів на ринку України щороку зростає (Kotsiumbas et al., 2015). Вітаміновмісні препарати значно відрізняються один від одного за складом власне діючих речовин, так і за матрицею (особливо це стосується кормів і преміксів) (Kotsiumbas et al., 2015). У зв'язку з такою мінливістю складу часто постає необхідність в адаптації існуючих рутинних методик з метою підвищення їх селективності, для кількісного визначення вітамінів у ветеринарних препаратах та кормових добавках. Відома рідинно-хроматографічна методика визначання кількості рибофлавіну та флавінмононуклеодиту (Rychlik, 2011). Ця методика є нескладною у виконанні та вимагає порівняно невеликих витрат часу та ресурсів. Метою даної роботи було перевірити вплив зміни ряду умов хроматографічного розділення на селективність методики (величину фактора розділення) та її здатність одночасно визначати декілька різних вітамінів).

Матеріали і методи. У роботі використовували сертифіковані стандартні зразки вітамінів (тіаміну гідрохлориду, рибофлавіну, флавінмононуклеотид фосфату, нікотинової кислоти, нікотинаміду, пантотенату кальцію, піридоксину гідрохлориду, аскорбінової кислоти, менадіону, ціанокобаламіну, фолієвої кислоти та біотину), виробництва Sigma-Aldrich. Основний розчин кожного вітаміну з концентрацією 100 мкг/мл готували з урахуванням чистоти зразка, зазначеній у сертифікаті, шляхом розчинення у 0,05 М фосфатному буферному розчині, дотитрованому до pH 3.0 1 М гідрооксидом натрію. Після цього основні розчини вітамінів розводили тим самим розчинником до потрібних концентрацій робочих розчинів (10–20) мкг/мл. Фолієву кислоту розчиняли у 0,1 М натрію гідрооксиді, і її кінцева концентрація становила – 10 мкг/мл. Для готування зразків використовували кислоту фосфатну та гідрооксид натрію виробництва Sigma-Aldrich.

Хроматографічний аналіз виконано на рідинному хроматографі фірми Waters, оснащеному сепараційним модулем Alliance 2690 з діодноматричним детектором PAD 996. Вихідні (початкові) 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, pH 3,0) у співвідношенні 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 – 14 хвилин. Довжина хвилі детекції – 265 нм. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010 [4].

Результати й обговорення. Хроматограми розчинів стандартних зразків рибофлавіну та флавінмононуклеотиду, одержані за вищеписаних початкових умов розділення, представлені на рисунку 1.

Рис. 1. Хроматограми розчинів стандартних зразків флавінмононуклеотиду – 1 та рибофлавіну – 2. Концентрація кожного вітаміну – 20 мкг/мл.

Окрім рибофлавіну та флавінмононуклеотиду у склад преміксів та кормів для продуктивних та непродуктивних свійських тварин часто включають тіамін гідрохлорид, аскорбінову кислоту, піридоксину гідрохлорид, нікотинову кислоту, пантотенату кальцію, біотин, фолієву кислоту та ціанокобаламін (Kotsiumbas et al., 2015). Тому наступним кроком у дослідженні було включення цих вітамінів до складу тестової суміші та їх розділення, використовуючи ту саму вихідну схему хроматографічного аналізу (рис. 2.), та детектуючи вітаміни при двох довжинах хвилі поглинання: 195 нм (для пантотенату кальцію, біотину, фолієвої кислоти, ціанокобаламіну) та 265 нм (для тіаміну гідрохлориду, аскорбінової кислоти, піридоксину гідрохлориду, нікотинової кислоти).

Оскільки піки тіаміну гідрохлориду (1), аскорбінової кислоти (2), піридоксину гідрохлориду (3) та нікотинаміду (4) недостатньо розділились, в наступному варіанті розділення було зменшено кількість ацетонітрилу у рухомій фазі до 3 %, зменшено також кінцеву концентрацію вітамінів до 10 мкг/мл і додано стандарт нікотинової кислоти (рис. 3).

Рис. 2. Хроматограма суміші вітамінів (тіаміну гідрохлориду –1, аскорбінової кислоти – 2, піридоксину гідрохлориду – 3, нікотинаміду – 4, пантотенату кальцію – 5, фолієвої кислоти – 6, ціанокобаламіну – 7, рибофлавіну – 8 та біотину – 9) за початковою схемою аналізу (концентрація кожного – 50 мкг/мл).

Рис. 3. Хроматограма суміші вітамінів (тіаміну гідрохлориду –1, аскорбінової кислоти – 2, нікотинаміду – 3, піридоксину гідрохлориду – 4 та нікотинової кислоти – 5) за новою схемою аналізу (концентрація кожного – 50 мкг/мл).

За таких умов ізократичного елюювання час виходу інших вітамінів був досить довгим (90–100 хвилин хроматографування), і параметри піків не задовольняли вимоги ДФУ 2.0. Тому, в подальших експериментах, для розділення вітамінів використали градієнтне елюювання. Співвідношення рухомих фаз наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Умови градієнтного елюювання

T, хв	A, %	B, %
0	3	97
7	3	97
12	10	90
31	10	90
35	14	86
40	14	86
50	3	97
70	3	97

Примітка: тут і далі: T – час від початку розділення (хв);

A – вміст ацетонітрилу в рухомій фазі (%);

B – вміст 0,05 М фосфатного буферу pH 3,0 в рухомій фазі (%)

Хроматограми розчинів стандартних зразків вітамінів, одержані за вищеписаних умов градієнтного елюювання, представлені на рисунку 4.

Рис. 4. Хроматограми розчинів стандартних зразків вітамінів (тіаміну гідрохлориду – 1, аскорбінової кислоти – 2, нікотинамід – 3; піридоксину гідрохлориду – 4, нікотинової кислоти – 5, пантотенату кальцію – 6, флавінмононуклеотиду – 7, біотину – 8, менадіону – 9, ціанокобаламіну – 10, рибофлавіну – 11 (концентрація вітамінів – 10 мкг/мл.).

Параметри хроматографічних піків вітамінів відповідали вимогам ДФУ (табл. 2).

Таблиця 2

Параметри хроматографічних піків вітамінів, розділених за градієнтною схемою аналізу

Назва піків	Кількісні параметри хроматографічних піків				
	Час виходу піку (хв)	Симетрія піку	Кількість теоретичних тарілок	Ширина піку (хв)	Коефіцієнт розділення
Тіамін гідрохлорид	3,1	1,19	5134	0,6	2,02
Аскорбінова кислота	4,0	1,51	4861	0,5	2,01
Нікотинова кислота	4,6	1,53	7045	0,5	2,04
Піридоксид гідрохлорид	5,4	1,43	8876	0,8	2,06
Нікотинамід	6,1	1,17	10451	0,7	2,03
Кальцій пантотенат	15	0,95	54222	0,8	3,14
Флавінмононуклеотид	16,6	1,50	89461	0,5	3,14
Біотин	18,4	1,02	37562	1,0	3,14
Менадіон	27,6	1,08	39991	0,9	6,67
Ціанокобаламін	37,5	1,51	93513	0,6	3,4
Рибофлавін	39,6	1,06	99473	1,0	3,4
Вимоги, згідно з ДФУ (Derzhavna Farmakopeia Ukrainy, 2001)	-	0,8–2,0	>1000	≥2,0	≥2,0

Оскільки фолієва кислота є важливим компонентом багатьох преміксів, але на відміну від інших вітамінів погано розчиняється при кислому рН середовища, використовували 0,1 М розчин натрію гідроксиду. Хроматограма стандартного зразку фолієвої кислоти представлена на рисунку 5.

Час виходу піку фолієвої кислоти – 16,9 хвилини, ширина піку – 0,8 хвилин, а отже цей хроматографічний пік не зливається з іншими піками водорозчинних вітамінів. Симетрія піку – 1,55, кількість теоретичних тарілок – 82747, а коефіцієнт розділення – 2,1. Параметри хроматографічного піку фолієвої кислоти не виходять за рамки, рекомендовані ДФУ 2.0.

Рис. 5. Хроматограма розчину стандартного зразку фолієвої кислоти.

Отже, в результаті розробленої модифікації методики вдалось розділити 12 вітамінів, використовуючи градієнтне елюювання. Параметри хроматографічних піків є у межах зазначених ДФУ 2.0, що дозволяє валідувати методику.

В И С Н О В К И

Запропоновано оптимізацію рутинної методики рідиннохроматографічного визначання ряду водорозчинних вітамінів, що полягає у зміні режимів елюювання. Це дозволяє визначати одночасно 11 вітамінів, які найчастіше входять до складу ветеринарних препаратів, кормів та преміксів. При цьому кількісні характеристики хроматографічних піків, такі як асиметрія, кількість теоретичних тарілок, коефіцієнт розділення не виходить за межі, рекомендовані у ДФУ.

Перспективи досліджень. Валідація методики визначення вітамінів у різних матрицях, зокрема у пероральних та ін'єкційних розчинах, преміксах та кормах.

References

- Derzhavna Farmakopeia Ukrainy. Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr» Kharkiv: RIREH, 2001. 556 p. [In Ukrainian].
- Kotsiumbas, I.Ya., Kosenko, Yu.M. et al. (2015). Dovidnyk kormovykh dobavok i premiksiv. Lviv: TzOV VF «Afisha». 1408. [In Ukrainian].
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2011). Lehninger Principles of biochemistry. Fifth edition. New York: W. H. Freeman and company. 1282.
- Rychlik, M., editor. (2011). Fortified Foods with Vitamins: Analytical Concepts to Assure Better and Safer Products. New York: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.,– 292 p.
- Statystychnyi analiz rezultativ khimichnoho eksperymentu Derzhavna farmakopeia Ukrainy. Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr». Kharkiv: RIREH. Dopovnennia 1. 2004. 196–198. [In Ukrainian].