

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СМЕСЕЙ ВИТАМИНОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛИНЕЙНОЙ РЕГРЕССИИ

И.В. Власова, А.С. Шелпакова, ¹Е.Н. Масякова

ГОУ ВПО Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского
644077 Омск, пр. Мира, 55а
¹ГНУ Сибирский НИИ птицеводства РАСХН
644550, Омская область, Омский район, пос. Морозовка
vlaso-iri@yandex.ru

Поступила в редакцию 20 апреля 2009 г.

Применение метода множественной линейной регрессии в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей витаминов позволяет одновременно определять 4-6 компонентов с перекрывающимися спектрами. Оптимизация спектральных диапазонов позволяет снизить погрешности и коэффициенты вариации до 5 % относительных, и менее.

Ключевые слова: множественная линейная регрессия, спектрофотометрический анализ, определение витаминов, анализ неразделенных смесей.

Власова Ирина Васильевна, доцент кафедры аналитической химии Омского государственного университета им. Ф.М. Достоевского, к.х.н.

Область научных интересов – спектроскопический анализ неразделенных смесей органических веществ.

Опубликовано 55 работ, в том числе 3 авторских свидетельства.

Шелпакова Анна Сергеевна – аспирант кафедры аналитической химии Омского государственного университета им. Ф.М. Достоевского.

Область научных интересов – хемометрика, анализ многомерных данных, спектроскопический анализ неразделенных смесей органических веществ.

Опубликовано 7 работ.

Масякова Елена Николаевна – химик-аналитик, ГНУ Сибирский НИИ птицеводства РАСХН.

Область научных интересов – спектроскопический анализ неразделенных смесей органических веществ, хроматографический анализ водорастворимых витаминов;

Опубликовано 14 работ.

Для анализа многокомпонентных смесей органических веществ традиционно применяются различные хроматографические методы. Так, многокомпонентные смеси водорастворимых витаминов обычно разделяют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [1-3]. Применительно к рутинным анализам спектрофотометрия является более экономичным и экспрессным методом, чем ВЭЖХ. Для спектрофотометрического анализа требуется более простое и доступное оборудование, не нужны дорогие и токсичные растворители. Это немаловажно при проведении технического контроля. Основной недостаток спектрофотометрии – низкая селективность из-за наложения спектров поглощения разных

витаминов. Поэтому в анализе сложных поливитаминных препаратов, например, премиксов, классическую спектрофотометрию в настоящее время практически не используют.

Известно, что применение метода множественной линейной регрессии (МЛР) и других хемометрических алгоритмов расширяет возможности спектрофотометрии и позволяет анализировать некоторые смеси без разделения компонентов [4-6]. Для спектрофотометрического анализа поливитаминных препаратов метод МЛР ранее не применялся. Не ясно, какой может быть точность соответствующих методик анализа, особенно при не вполне аддитивном светопоглощении компонентов. Спектрофотометрический анализ премиксов осложняется и

Таблица 1

Качественный и количественный состав растворов «номинальных» смесей

Моделируемый премикс	Количество компонентов	Концентрация витаминов, мкг/мл					
		B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	K ₃
-	4	-	2,0	3,4	10,0	1,3	-
Премикс 0,1 % на цеолите	5	0,5	2,0	10,0	15,0	2,0	-
Премикс 0,25 % на цеолите	6	1,1	2,6	4,4	13,2	1,8	0,9

тем, что содержания разных витаминов в одном и том же образце могут сильно различаться (на порядок и более).

Целью настоящего исследования была разработка методик спектрофотометрического определения витаминов в многокомпонентных смесях с использованием МЛР, а также оценка аналитических возможностей соответствующих методик. Объекты исследования - четырех-, пяти- и шестикомпонентные модельные смеси витаминов B₁, B₂, B₃, B₅, B₆ и K₃. (химически чистые реактивы производства фирмы Supelco, США). Качественный и количественный состав всех смесей примерно соответствовал реальному составу премиксов. Кроме «номинальных» смесей, состав которых точно соответствовал рецептуре какого-либо премикса (табл. 1), было

приготовлено несколько десятков других модельных смесей, где содержание одного или нескольких витаминов отличалось на ±10 или ±20 отн. % от содержания того же витамина в растворе соответствующей «номинальной» смеси. Растворы витаминов и их модельных смесей готовили, используя в качестве растворителя 0,01 М водный раствор соляной кислоты.

Спектры поглощения растворов индивидуальных витаминов (рисунок) и их смесей регистрировали на компьютеризированном спектрофотометре СФ-2000 в кварцевых кюветках толщиной l = 1,0 см, в диапазоне 200-500 нм с шагом 0,2 нм. Для вычисления удельных k_{уд} коэффициентов поглощения регистрировали спектры растворов индивидуальных витаминов для трех разных концентраций (С, мкг/мл), проводя на каждом концентрационном уровне не менее 5 повторных измерений оптической плотности (А). Расчет удельных коэффициентов вели по формуле:

$$k_{уд} = \frac{A}{l \cdot C} \quad (1)$$

Полученные результаты усредняли. Сходимость вычисленных коэффициентов поглощения характеризуется относительным стандартным отклонением S_r = 0,005-0,01.

Алгоритм МЛР предусматривает решение переопределенной системы алгебраических уравнений. Расчеты концентраций по методу МЛР выполняли с применением пакета Microsoft Excel - опция «Анализ данных», подфункция – «Регрессия». В нашем случае каждая система содержала несколько сот линейных уравнений вида:

$$A^i = \sum_{j=1}^n k_j^\lambda \cdot l \cdot c_j \quad (2)$$

где Aⁱ – оптическая плотность раствора смеси на i-ой длине волны, k_j^λ - удельный коэффициент поглощения j-го витамина на той же длине вол-

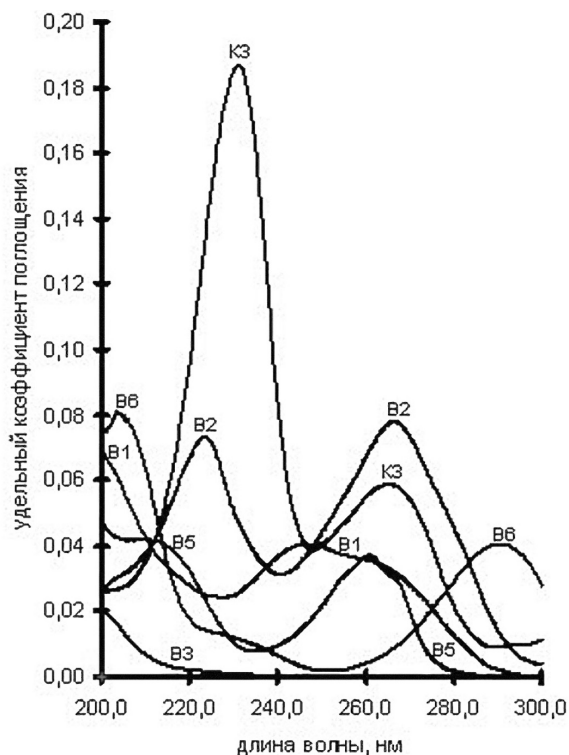


Рис. Спектры поглощения растворов индивидуальных витаминов в среде 0,01М НСl

ны, а C_j - концентрация этого витамина в растворе. Величина n (число компонентов) равна 4-6.

Перед применением МЛР необходимо было проверить аддитивность светопоглощения растворов смесей. Оказалось, что спектры всех исследованных 4-компонентных смесей аддитивны, а в спектрах 5-6-компонентных смесей имеются небольшие участки со статистически значимыми ($\alpha = 0,05$) отклонениями от аддитивности (обычно положительными).

Выполнение условия аддитивности в случае 4-х компонентной смеси витаминов позволило провести предварительный компьютерный эксперимент, целью которого было оптимизировать условия анализа соответствующих смесей. Вначале, используя найденные в эксперименте коэффициенты поглощения и задавая концентрации витаминов, моделировали идеальной спектр соответствующей смеси, затем «возмущали» его с помощью подфункции пакета Excel «Генерация случайных чисел», моделируя случайные погрешности измерений. При этом учитывали схожесть соответствующих коэффициентов поглощения. Моделирование вели по формуле:

$$A^{*i} = A^i + \sum_{j=1}^n \kappa_j^i \cdot l \cdot S_j^i \cdot C_j \cdot P. \quad (3)$$

где A^{*i} - «возмущенная» оптическая плотность смеси при i -ой длине волны, A^i - «идеальная» оптическая плотность той же смеси при той же длине волны, вычисленная по уравнению (2), S_j^i - стандартное отклонение коэффициента поглощения j -го компонента при i -ой длине волны, P - положительное или отрицательное случайное число, получаемое с помощью нормально распределенной генерации случайных чисел (среднее = 0, $S = 0.1$). Таким способом получали по три «возмущенных» спектра каждой смеси. Обработка этих данных в широком диапазоне длин волн, стандартным методом МЛР привела к неудовлетворительным результатам: погрешности определения некоторых витаминов иногда достигали 15 отн. % и более. Методики анализа оптимизировали путем подбора для

каждого витамина своего спектрального диапазона, который, как правило, соответствовал максимумам поглощения компонентов. Например, для витамина B_2 это области 282-301 и 367-375 нм, для B_5 - 210-232 нм, для B_6 - 200-230 и 260-301 нм. Что касается B_3 , ввиду его наименьшего вклада в оптическую плотность смесей (4-6 компонентных), подобрать для него оптимальный спектральный диапазон удается только с применением разностного спектра, т.е. после вычитания из оптической плотности смеси вклада основного компонента - витамина B_5 . В итоге для определения витамина B_3 это получились области 200-230 и 260-301 нм.

Найденные в компьютерном эксперименте спектральные диапазоны были затем использованы для анализа реальных смесей (расчет концентраций в этом случае вели при трехкратном повторении всех операций). Из результатов, представленных в табл. 2, видно, что оптимизированная методика анализа 4-компонентной смеси по методу МЛР дает довольно точные результаты. Как правило, относительные погрешности (δ , %) и коэффициенты вариации (W , %) для всех компонентов не превышают 5 отн. % (по модулю). Отметим, что изложенный выше способ подбора условий анализа, основанный на проведении компьютерного эксперимента, в известной нам литературе не описан.

В спектрах 5-6-компонентных смесей имеются отдельные участки, где были выявлены статистически значимые отклонения от аддитивности, например, область 200-220 нм. В подобных случаях компьютерное моделирование спектров смесей невозможно. Для оптимизации условий анализа соответствующих смесей из общего спектрального диапазона исключали «неаддитивные» участки, а также те участки спектра, на которых погрешности определения компонентов превышали 20 отн. %.

Затем рассчитывали содержания компонентов по методу МЛР. Оказалось, что результаты определения трех витаминов (B_2 , B_5 и B_6) вполне удовлетворительны при использовании одного и того же широкого спектрального диа-

Таблица 2

Сравнение результатов компьютерного моделирования и анализа реальной смеси ($n = 3, P = 0,95$)

Витамин	Введено, мкг/мл	Компьютерное моделирование			Реальная смесь		
		Найдено, мкг/мл	δ , %	W , %	Найдено, мкг/мл	δ , %	W , %
B_2	2,4	2,48	3,3	0,1	2,53	5,5	0,1
B_5	12,0	11,81	-1,6	3,3	11,72	-2,3	4,9
B_6	1,6	1,57	-1,6	0,1	1,57	-2,1	0,1
B_3	3,4	3,44	1,2	0,9	3,49	2,7	4,7

Таблица 3

Результаты определения витаминов в 6-компонентной модельной смеси

Витамин	Введено, мкг/мл	Диапазон длин волн, нм	Найдено, мкг/мл	δ , %	W, %
B ₂	2,4	220-500	2,30	3,4	0,2
B ₅	12,0	220-500	12,10	0,8	0,3
B ₆	1,6	220-500	1,52	-5,1	0,6
K ₃	0,8	220-245, 254-265 *	0,85	6,2	0,7
B ₁	1,0	230-274*	1,02	4,1	2,2
B ₃	4,0	220-500	5,56	38,9	1,9

Примечание: * - найдено по разностному спектру.

пазона 220-500 нм. Еще два витамина (K₃ и B₁) хорошо определяются только по разностному спектру (после исключения вклада ранее найденного витамина B₅) и ограничения спектрального диапазона. Витамин B₃ в подобных смесях точно определить не удастся. Независимо от выбранного спектрального диапазона относительная погрешность определения слабопоглощающего в УФ-области витамина B₃ в 6-компонентных смесях достигала 40 отн. %. Вероятно, это обусловлено небольшим вкладом данного витамина в оптическую плотность смеси, поэтому для его определения необходимо проводить дериватизацию, то есть переводить его в интенсивно поглощающее соединение.

В табл. 3 приведены результаты определения витаминов в 6-компонентной «номинальной» смеси с использованием выбранных спектральных диапазонов. Смеси, состав которых отличался от номинальных на 10 или 20 отн. %, также были исследованы по данной методике. Если спектральные диапазоны заранее выбраны, а коэффициенты поглощения компонентов на соответствующих длинах волн определены,

время анализа одной смеси не превышает 20 минут.

Разработанная методика была применена к анализу реальных объектов – премиксов. Как видно из табл. 4, результаты по содержанию витаминов, полученные методом МЛР, отличаются от рецептуры премиксов, что подтверждает необходимость аналитического контроля этой продукции.

Таким образом, если рассчитывать содержания компонентов методом МЛР, можно достаточно точно и быстро определять все витамины в 4-5-компонентных смесях, состав которых близок (± 20 отн. %) составу реально используемых поливитаминовых препаратов. Без дериватизации удастся таким же способом определить 5 витаминов и в 6-компонентных смесях, даже если содержания компонентов различаются на порядок и более, а условие аддитивности выполняется не на всех длинах волн. Более простые алгоритмы расчета (например, классический вариант метода Фирордта) вообще не позволяют анализировать такие сложные смеси с требуемой точностью [6]. Однако, чтобы снизить относительные погрешности и коэффици-

Таблица 4

Результаты определения витаминов методом МЛР в премиксах

Премикс 0,1 % на цеолите			Премикс 0,25 % на цеолите		
Витамин	Содержание по рецептуре, мг/г	Найдено МЛР, мг/г	Витамин	Содержание по рецептуре, мг/г	Найдено МЛР, мг/г
B ₁	1,0	0,81	B ₁	0,8	0,68
B ₂	4,0	3,35	B ₂	2,4	2,05
B ₃	20,0	16,3	B ₃	4,0	3,4
B ₅	30,0	26,4	B ₅	16,0	13,55
B ₆	4,0	3,4	B ₆	1,2	1,0
			K ₃	0,8	0,69

енты вариации соответствующих методик до приемлемого уровня (до 5-6 отн. %), надо заранее оптимизировать спектральные диапазоны, которые будут использованы при расчете содержания каждого компонента.

Литература

1. Кожанова Л.А., Федорова Г.А., Барам Г.И. Определение водо- и жирорастворимых витаминов в поливитаминных препаратах методом ВЭЖХ // Ж. аналит. химии. 2002. Т. 57. С. 49-54.
2. Арбатский А.П., Афоньшин Г.Н., Востоков В.М. Определение витаминов в кормовых и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Ж. аналит. химии. 2004. Т. 59, № 12. С. 1304-1307.
3. Власова И.В., Мясякова Е.Н., Богданова Л.А., Пермякова Н.Ю. Определение водорастворимых витаминов в премиксах методом высоко-

эффективной жидкостной хроматографии // Западская лаборатория. 2007. Т. 73, № 9. С.25-27.

4. Dinc Erdal, Baleanu Dumitru. Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods // J. Pharm. and Biomed. Anal. 2002. V. 30. № 3. P. 715-723.

5. Мясякова Е.Н., Шелпакова А.С., Феллер А.В., Власова И.В. Определение водорастворимых витаминов группы В в неразделенных смесях // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Сб. научн. тр. Вып. 63. Пятигорск: Изд-во Пятигорская фармацевтическая академия. 2008. С. 303-304.

6. Власова И.В., Шилова А.В. Повышение точности определения компонентов в двухкомпонентных смесях по методу Фирордта // Вестник Омского университета. 2006. № 2. С. 53-55.

SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF VITAMIN'S MIXTURES BY MULTIPLE LINEAR REGRESSIONS

I.V. Vlasova, A.S. Shelpakova, ¹E.N. Masjakova

*Omsk state university it. F.M.Dostoevskogo,
¹Siberian Poultry Institute
vlaso-iri@yandex.ru*

The application of method Multiple Linear Regressions in the spectrophotometric analysis of undivided mixtures vitamins with overlapping of the absorbance spectra allow conducting simultaneous determination of all components in 4-6 component mixtures. The optimization of spectral ranges conduces to decrease of error and variation coefficient below 5 %

Key words: multiple linear regressions, spectrophotometric analysis, determination of vitamins, analysis of undivided mixtures.