

РЭСПУБЛІКА БЕЛАРУСЬ



ПАТЭНТ

НА ВЫНАХОДСТВА

№ 19205

Способ определения витамина B₆ в молоке или молочных продуктах

выдадзены

Нацыянальным цэнтрам інтэлектуальнай уласнасці
ў адпаведнасці з Законам Рэспублікі Беларусь
«Аб патэнтах на вынаходствы, карысныя мадэлі, прамысловыя ўзоры»

Патэнтаўладальнік (патэнтаўладальнікі):

Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр гигиены" (BY)

Аўтар (аўтары):

Шуляковская Ольга Васильевна; Бельшева Людмила Леонидовна; Полянских Елена Ильинична (BY)

Заявка № а 20120848

Дата падачы: 31.05.2012

Зарэгістравана ў Дзяржаўным рэестры
вынаходстваў:

18.02.2015

Дата пачатку дзеяння:

31.05.2012

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ (19) BY (11) 19205



(13) C1

(46) 2015.06.30

(51) МПК

G 01N 30/06 (2006.01)

G 01N 33/04 (2006.01)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(54)

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА В6 В МОЛОКЕ ИЛИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

(21) Номер заявки: а 20120848

(22) 2012.05.31

(43) 2014.02.28

(71) Заявитель: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр гигиены" (BY)

(72) Авторы: Шуляковская Ольга Васильевна; Бельшева Людмила Леонидовна; Полянских Елена Ильинична (BY)

(73) Патентообладатель: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр гигиены" (BY)

(56) ASADULLAH et al. Journal of Pakistan Medical Association. - 2010. - V. 60. - Is. 11. - P. 909-912.

KALL M.A. Food Chemistry. - 2003. - V. 82. - Is. 2. - P. 315-327.

NDAW S. et al. Food Chemistry. - 2000. - V. 71. - Is. 1. - P. 129-138.

СТБ EN 14663-2012. Продукты пищевые. Определение витамина В₆ (включая гликозилированные формы) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). - Минск: Госстандарт.

ARGOUDELIS C.J. Journal of Chromatography A. - 1997. - V. 790. - Is. 1-2. - P. 83-91.

GATTI R. Analytica Chimica Acta. - 2005. - V. 538. - Is. 1-2. - P. 135-141.

HEUDI O. et al. Journal of Chromatography A. - 2005. - V. 1070. - Is. 1-2. - P. 49-56.

ALBALÁ-HURTADO S. et al. Journal of Food Science. - 2001. - V. 66. - No. 8. - P. 1191-1194.

RU 2318216 C2, 2008.

WOOLLARD D.C. et al. Journal of AOAC International. - 2002. - V. 85. - No. 4. - P. 945-951.

(57)

Способ определения содержания витамина В₆ в молоке или молочных продуктах, включающий кислотный гидролиз исследуемого образца раствором соляной кислоты, ферментативный гидролиз полученного гидролизата с ферментным препаратом тарактадиастаза, анализ полученного гидролизата с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и количественный расчет содержания витамина В₆ в анализируемом образце, отличающийся тем, что после ферментативного гидролиза проводят очистку гидролизата трихлоруксусной кислотой, а витамин В₆ рассчитывают как сумму массовых долей витамеров витамина В₆: пиридоксина, пиридоксала и пиридоксамина.

Изобретение относится к медицине, к разделу лабораторной диагностики, а также к пищевой промышленности.

Известен способ определения внесенного витамина В₆ (пиридоксина) в пищевых продуктах, основанный на кислотном ферментативном гидролизе образца, преобразовании пиридоксамина под действием катализатора в пиридоксал и далее в щелочной среде в пиридоксинс последующим его анализом с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и количественным расчетом его содержания в анализируемом образце [1].

BY 19205 C1 2015.06.30

BY 19205 С1 2015.06.30

Указанный способ является прототипом по отношению к заявляемому. Общими признаками для заявляемого способа и прототипа является проведение кислотного и ферментативного гидролиза исследуемого образца с последующим анализом витамина В₆ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и количественным расчетом его содержания в анализируемом образце.

Однако он сложен в исполнении, требует большого количества реагентов.

Задачей заявляемого изобретения является разработка упрощенного способа определения витамина В₆ в молоке или молочных продуктах с высокой точностью и сходимостью результатов.

Поставленная задача достигается следующим образом.

Предложен способ определения содержания витамина В₆ в молоке или молочных продуктах, включающий кислотный гидролиз исследуемого образца раствором соляной кислоты, ферментативный гидролиз полученного гидролизата с ферментным препаратом тарактаза, анализ полученного гидролизата с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и количественный расчет содержания витамина В₆ в анализируемом образце, отличающийся тем, что после ферментативного гидролиза проводят очистку гидролизата трихлоруксусной кислотой, а витамин В₆ рассчитывают как сумму массовых долей витамеров витамина В₆: пиридоксина, пиридоксаля и пиридоксамина.

Витамин В₆ в молоке или молочных продуктах - это сумма массовых долей пиридоксина (PN), пиридоксаля (PL) и пиридоксамина (PM), включая их фосфорилированные соединения, определяемые как пиридоксин. Поэтому целесообразно определять сумму указанных выше витамеров витамина В₆.

Такой прием позволяет получить хроматограмму с четко разделенными пиками определяемых витамеров витамина В₆, что способствует определению его содержания с высокой точностью и сходимостью результатов.

Пример.

Способ определения витамина В₆ в молоке или молочных продуктах.

1. Кислотный гидролиз.

Испытуемый образец измельчают или перемешивают с помощью гомогенизатора или тщательно перемешивают. Взвешивают навеску массой 1-3 г с точностью $\pm 0,001$ г, помещают в коническую колбу вместимостью 100 см³ и осторожно, тщательно перемешивая, добавляют 50 см³ раствора соляной кислоты молярной концентрацией $c(HCl) = 0,1$ моль/дм³. Колбу помещают на водяную баню и кипятят 30 \pm 1 мин.

Затем гидролизат охлаждают до 25 \pm 5 °C под струей холодной воды и доводят активную кислотность до pH 4,2-4,5 с помощью насыщенного раствора уксуснокислого натрия (2,5-3 см³).

2. Ферментативный гидролиз.

К полученному по п. 1 гидролизату добавляют 2,0 см³ раствора ферментного препарата тарактазы массовой концентрацией 0,02 г/см³. Содержимое колбы перемешивают и помещают в термостат на 14 ч при температуре 37 \pm 2 °C.

3. Очистка гидролизата.

К полученному по п. 2 гидролизату добавляют 2 см³ 50 %-го раствора трихлоруксусной кислоты с целью полного осаждения белков. Затем колбу с гидролизатом помещают на водяную баню и кипятят 5 мин, охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды. Далее гидролизат количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ (смывают остатки пробы со стенок колбы небольшими порциями воды (3-4 см³), доводят объем дистиллированной водой до метки и фильтруют через бумажный фильтр. На этой стадии, если есть необходимость, можно прервать анализ на 1-2 дня. До проведения анализа фильтрат хранят в холодильнике в плотно закрытой емкости (посуде).

4. Приготовление растворов.

4.1. Приготовление градуировочных растворов.

BY 19205 С1 2015.06.30

4.1.1. Приготовление основного градуировочного раствора пиридоксина концентрацией 500 мкг/см³.

Взвешивают 0,100 ± 0,0001 г пиридоксина на весах 2-го класса точности, помещают в мерную колбу вместимостью 200 см³, добавляют 100-130 см³ 0,1 М раствора HCl, перемешивают до полного растворения пиридоксина и доводят до метки 0,1 М раствором HCl.

Раствор хранят при температуре 6 ± 2 °C в темном месте не более 2 мес.

4.1.2. Приготовление основного градуировочного раствора пиридоксала концентрацией 500 мкг/см³.

Взвешивают 0,1218 ± 0,0001 г хлорида пиридоксала на весах 2-го класса точности, помещают в мерную колбу вместимостью 200 см³, добавляют 100-130 см³ 0,1 М HCl, перемешивают до полного растворения пиридоксала и доводят до метки 0,1 М HCl.

Раствор хранят при температуре 6 ± 2 °C в темном месте не более 2 мес.

4.1.3. Приготовление основного градуировочного раствора пиридоксамина концентрацией 500 мкг/см³.

Взвешивают 0,1540 ± 0,0001 г пиридоксаминадигидрохлоридагидрата на весах 2-го класса точности, помещают в мерную колбу вместимостью 200 см³, добавляют 100-130 см³ 0,1 М раствора HCl, перемешивают до полного растворения пиридоксамина и доводят до метки 0,1 М раствором HCl.

Раствор хранят при температуре 6±2 °C в темном месте не более 2 мес.

4.1.4. Приготовление рабочего градуировочного раствора трехкомпонентной смеси витамина В₆ концентрацией 5,0 мкг/см³ (раствор А).

Отбирают по 1,0 см³ растворов: пиридоксина, приготовленного по п. 4.1.1, пиридоксала, приготовленного по п. 4.1.2, и пиридоксамина, приготовленного по п. 4.1.3. Помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Рабочий раствор готовят в день проведения измерения. Хранению не подлежит.

4.1.5. Приготовление рабочего градуировочного раствора трехкомпонентной смеси витамина В₆ концентрацией 0,05 мкг/см³ (раствор В).

Отбирают 1,0 см³ рабочего раствора трехкомпонентной смеси витамина В₆, приготовленного по п. 4.1.4. Помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой.

Рабочий раствор готовят в день проведения измерения. Хранению не подлежит.

4.1.6. Приготовление градуировочных растворов трехкомпонентной смеси витамина В₆.

Градуировочные растворы трехкомпонентной смеси витамина В₆ с концентрацией каждого компонента по 0,005, 0,010, 0,050, 0,100 мкг/см³ готовят по схеме, представленной в табл. 1.

Аликовтные части рабочих градуировочных растворов (А и В) переносят в мерные колбы и доводят 0,1 М раствором HCl до метки при 20 ± 2 °C. Растворы готовят непосредственно перед применением. Хранению не подлежат.

Таблица 1

Схема приготовления градуировочных растворов витамина В₆

№ градуировочного раствора	Объем аликовтной части градуировочного раствора трехкомпонентной смеси витамина В ₆ , см ³	Объем мерной колбы, см ³	Концентрация пиридоксина в градуировочном растворе, мкг/см ³	Концентрация пиридоксала в градуировочном растворе, мкг/см ³	Концентрация пиридоксамина в градуировочном растворе, мкг/см ³
1	5,0 (раствор В)	50	0,005	0,005	0,005
2	2,0 (раствор В)	100	0,010	0,010	0,010
3	1,0 (раствор А)	100	0,050	0,050	0,050
4	2,0 (раствор А)	100	0,100	0,100	0,100

BY 19205 С1 2015.06.30

4.2. Приготовление буферного раствора с pH $2,5 \pm 0,1$.

В стакан вместимостью 1000 см³ помещают $4,50 \pm 0,001$ г калия фосфорнокислого однозамещенного и $1,73 \pm 0,001$ г октилсульфоната натрия, растворяют в 850 см³ дистиллированной воды. Измеряют pH полученного раствора. При необходимости регулируют кислотность до pH $2,5 + 0,1$ с помощью 10 %-го раствора ортофосфорной кислоты. Полученный раствор помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем дистиллированной водой до метки. Буферный раствор фильтруют через мембранный целлюлозный фильтр и хранят в склянке из темного стекла с завинчивающейся пробкой при комнатной температуре. Раствор стабилен в течение 1 мес.

5. Установление градуировочной характеристики.

Полученные по п. 4.1.4 растворы хроматографируют, начиная с самой низкой концентрации на жидкостном хроматографе с флуориметрическим детектором.

Условия хроматографирования:

хроматографическая колонка	C ₁₈
объем вводимой пробы	20 мкл
скорость подачи подвижной фазы	0,5 см ³ /мин
температура колонки	35 °C
длина волны экстинкции	287 нм
длина волны эмиссии	400 нм
усиление сигнала PMT-Gain	16
подвижная фаза	буферный раствор: ацетонитрил (90:10 об. %)

Каждый градуировочный раствор хроматографируют не менее 2-х раз, принимая за результат измерения среднее арифметическое параллельных измерений.

6. Построение градуировочных графиков.

Выполняется построение 3-х градуировочных графиков для каждой формы витамина В₆.

Для построения градуировочного графика устанавливают зависимость площади пиков от соответствующей концентрации пиридоксина (пиридоксала, пиридоксамина) в градуировочных растворах. По полученным данным для каждого градуировочного раствора рассчитывают коэффициенты регрессии *a* и *b* прямой $Y = a + bX$ методом наименьших квадратов.

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения

$$Y = a + bX, \quad (1)$$

где *Y* - площадь пика (norm, ед.);

X - концентрация в градуировочном растворе (мкг/см³);

a и *b* - коэффициенты регрессии.

7. Выполнение измерений.

Анализ полученных по п. 3 фильтрата и холостой пробы проводят на жидкостном хроматографе. Условия хроматографирования такие же, как и при построении градуировочного графика, п. 5. Определяют площади пиков, используя компьютерную систему обработки сигналов. Проводят анализ двух параллельных проб.

8. Обработка результатов измерений.

Расчет содержания витамина В₆ в фильтрате, полученном по п. 3, *X*, мг/100 г, проводят по формуле:

$$X = \frac{(C_1 + C_2 + C_3) \times V}{m \times V}, \quad (2)$$

где *C₁* - концентрация пиридоксина в пробе, найденная по градуировочному графику, мкг/см³;

C₂ - концентрация пиридоксала в пробе, найденная по градуировочному графику, мкг/см³;

C₃ - концентрация пиридоксамина в пробе, найденная по градуировочному графику, мкг/см³;

BY 19205 C1 2015.06.30

m - масса навески, г;

V - общий объем гидролизата, 100 см³;

10 - коэффициент пересчета на 100 г продукта.

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений. Вычисления проводят до третьего знака после запятой и округляют до второго.

Результаты определения витамина В₆ в молоке и молочных продуктах представлены в табл. 2.

Таблица 2

Содержание витамина В₆ в молоке и молочных продуктах

Наименование продукта	Содержание витамина В ₆ , мг/100 г					
	PL	PN	PM	Общее содержание	Маркировочные данные	Справочные данные [2]
Молоко	0,04	0,008	0,006	1	0,050	
				2	0,054	
				3	0,051	
				ср	0,0516	0,05
Молочная смесь "Фри-сопре"	0,08	0,620	0,030	1	0,73	
				2	0,725	
				3	0,727	
				ср	0,7273	0,7
Сухое молоко	0,08	0,016	0,029	1	0,135	
				2	0,125	
				3	0,130	
				ср	0,130	0,12
Обогащенное молоко	0,025	0,360	0,008	1	0,390	
				2	0,385	
				3	0,380	
				ср	0,385	0,36
Творог	0,09	0,0420	0,061	1	0,19	
				2	0,18	
				3	0,185	
				ср	0,19	0,19
Сметана	0,04	0,006	0,030	1	0,076	
				2	0,068	
				3	0,070	
				ср	0,0713	0,07

Таким образом, достигаемый технический результат заключается в том, что способ позволяет определять в молоке и молочных продуктах витамин В₆ с высокой точностью и сходимостью результатов.

Источники информации:

1. Продукты пищевые. Определение витамина В₆ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. - Минск: Госстандарт. - 16 с. (прототип).
2. Химический состав пищевых продуктов / Под ред. И.М.Скурихина и М.Н.Волгарева. - М.: ВО Агропромиздат, 1987. - 223 с.