

Г. Б. Слепченко, Л. С. Анисимова, В. Ф. Слипченко,
Е. В. Михеева, Н. П. Пикула

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК МЕТОДАМИ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ В₁, В₂, С, Е И КВЕРЦЕТИНА

Томский политехнический университет

Разработаны экспрессные методики определения водорастворимых витаминов С, В₁, В₂, жирорастворимого витамина Е (α -токоферола ацетата) и кверцетина в биологически активных добавках вольтамперометрическим методом. Оценку характеристики систематической составляющей погрешности (показатель правильности) проводили с использованием образцов для аттестации и методом добавок определяемого вещества в пробу. Приписанные метрологические характеристики относительной погрешности методики: граница относительной погрешности – 25 %; предел воспроизводимости – 28 %; предел сходимости – 22 %. Время анализа с учетом пробоподготовки не превышает 2 ч. Установленные оптимальные условия проведения электродного процесса автоматизированы и программно обеспечены.

Биологически активные добавки (БАД) — концентраты натуральных или идентичных натуральным биологически активных веществ, предназначенных для непосредственного приема или введения в состав пищевых продуктов. Основу БАД составляют витамины, флавоноиды, микроэлементы, аминокислоты. Разработка способов определения качества таких продуктов представляет одну из важнейших задач аналитической химии. Критерием качества БАД может являться их анализ на содержание витаминов и флавоноидов [1 – 3].

Определение витаминов и флавоноидов проводят различными методами, наиболее известные из них титриметрические, колориметрические [4, 5] и флуориметрические [6, 7]. Данные методики являются, как правило, трудоемкими, а также требуют больших затрат времени и реактивов.

Широкое распространение при определении витаминов и флавоноидов получили различные варианты хроматографии и, особенно, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [8 – 10]. Несмотря на высокую чувствительность метода ВЭЖХ (10^{-4} – 10^{-5} мг/кг), длительность анализа с учетом времени пробоподготовки, а также высокая стоимость приборов существенно ограничивают его использование в контроле пищевых продуктов и БАД.

Публикации по определению витаминов и флавоноидов электрохимическими методами немногочисленны. Возможность полярографического определения витаминов показана в работах [11 – 13].

В настоящее время широко развивается вольтамперометрический метод анализа благодаря высокой чувствительности, простоте, селективности, экспрессности и дешевизне оборудования. Метод пригоден и для определения органических веществ.

Целью работы являлась разработка экспрессных методик определения витаминов С (аскорбиновой кислоты), В₁ (тиамина хлорида), В₂ (рибофлавина), Е (α -токоферола ацетата) и кверцетина в биологически активных добавках вольтамперометрическим методом.

Экспериментальная часть

Вольтамперометрические измерения проводили на компьютеризированных анализаторах СТА (ООО

“ИТМ”, Томск) в постоянноточковом (витамин Е), накопительном (витамины С, В₂, кверцетин) и дифференциально-импульсном (витамин В₁) режимах съемки вольтамперограмм, а также на серийном полярографе ПУ-1.

В качестве индикаторных электродов использовали ртутно-пленочный электрод (витамин В₁), стеклоуглеродный электрод (витамины С, В₂, Е, кверцетин). Электродом сравнения при определении водорастворимых витаминов и кверцетина служил насыщенный хлоридсеребряный электрод, при определении жирорастворимого витамина Е — ртутный электрод. Кислород удаляли пропуском газообразного азота через раствор.

В качестве объектов анализа использовали биологически активные добавки (БАД) ООО “Артлайф” (Томск), изготовленные из растительного сырья и представляющие собой таблетки, гранулы и капсулы сложной композиции.

Результаты и их обсуждение

Сущность разработанных методик определения витаминов и флавоноидов в БАД состоит в переводе проб биологически активных добавок в раствор путем растворения навесок соответствующих проб в воде (водорастворимые витамины и кверцетин) и экстракции хлороформом с использованием аппарата Сокслета (витамин Е) с последующим вольтамперометрическим (ВА) определением массовых концентраций анализируемых компонентов.

Витамин В₁ (тиамин, 4-метил-5- β -оксиэтил-N-(2-метил-4-амино-5-метилпиримидил)тиазолит бромид (хлорида) гидробромид (или гидрохлорид).

В качестве рабочего электрода выбран ртутный пленочный электрод, представляющий собой пленку ртути толщиной 10 – 20 мкм, нанесенную на серебряную подложку. Регистрируемые пики имеют удобную для измерения форму и хорошо воспроизводимы.

Для увеличения электропроводности водных растворов витамина В₁ и обеспечения оптимальных условий проведения электродного процесса исследован ряд электролитов: Na₂HPO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, KCl, Na₂B₄O₇, Na₃PO₄, NaClO₄, KNO₃, KClO₄, K₂CO₃, KI, буферные растворы Бриттона-Робинсона (рН 6,01 – 10,41). Оптималь-

ным фоном является 0,1 М Na₂HPO₄, в растворе которого линейный характер градуировочного графика находится в широком диапазоне определяемых концентраций.

Для количественного определения тиамин рекомендован вариант катодной вольтамперометрии в режиме первой производной при линейно-меняющемся потенциале на приборах ПУ-1 и в режиме дифференциально-импульсной вольтамперометрии с использованием анализатора СТА.

Сущность методики состоит в растворении витамина В₁ из проб БАД (навеской 1,0 – 3,0 г) в 0,05 М соляной кислоте, отделении нерастворенной части фильтрованием с последующим вольтамперометрическим определением массовой концентрации витамина В₁ методом дифференциальной вольтамперометрии.

Витамин В₂ (рибофлавин, 6,7-диметил-9-(D-1-рибтил)изоаллоксазин).

Для количественного определения рибофлавина можно использовать фоновые электролиты с широким диапазоном рН. По проведенным исследованиям для анализа БАД оптимальным фоновым электролитом выбран раствор 0,1 М HCl. Рабочий электрод — стеклоглеродный.

Зависимость аналитического сигнала от концентрации рибофлавина в таком растворе прямо пропорциональна диапазону определяемых содержаний от 0,1 до 10,0 г/кг пробы.

Сущность методики состоит в растворении витамина В₂ из проб БАД (навеской 1,0 – 3,0 г) в 0,01 М NaOH, отделении нерастворимой части фильтрованием и с последующим вольтамперометрическим определением массовой концентрации витамина В₂ методом дифференциальной анодной вольтамперометрии.

Кверцетин (3,5,1,3',4'-пентаоксифлавонол).

Флавоноиды переводят в раствор путем растворения навески пробы в 96 % этаноле при нагревании, с последующей фильтрацией. Вольтамперометрическое определение путем регистрации анодных пиков окисления ведут на стеклоглеродном электроде на фоне 0,1 М HCl.

При анализе кверцетина важным является выбор рН среды и скорости развертки потенциала. Для раздельного определения кверцетина и витамина С концентрация HCl должна быть 0,1 М, скорость развертки потенциала 10 – 15 мВ/с. Навеску 0,10 – 1,0 г БАД обрабатывают

этанолом (25 мл), экстрагируют кверцетин при перемешивании в течение 60 – 120 мин и фильтруют. Фильтрат доводят до 25 мл этанолом, анализируют аликвоту подготовленной пробы вольтамперометрическими методом.

Витамин С (аскорбиновая кислота).

Пробоподготовка БАД при определении витамина С имеет свои особенности:

при анализе БАД, содержащих флавоноиды, пробу растворяют в 0,1 М HCl с добавлением KCl;

при анализе БАД, не содержащих флавоноиды, пробу растворяют в 0,01 М HCl.

Процесс электрохимического окисления витамина С проводят в растворе 0,1 М KCl, подкисленном HCl до рН 3 – 4, либо в растворе 0,1 М HCl (если в БАД присутствует кверцетин), на индикаторном стеклоглеродном электроде в области потенциалов от 0,45 до 0,98 В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода в зависимости от рН среды.

Витамин Е (α-токоферола ацетат).

Для определения витамина Е предложен высокочувствительный метод дифференциальной вольтамперометрии (ДВА), основанный на способности витамина электрохимически окисляться на углеродных электродах различных типов [4]. В качестве индикаторных использовали графитовый электрод, пропитанный полиэтиленом с парафином в вакууме, стеклоглеродный и углеситалловый электроды. Наименьшее значение остаточного тока и лучшую воспроизводимость сигналов на вольтамперограмме наблюдали на стеклоглеродном электроде, который и был выбран в качестве рабочего.

В качестве фоновых электролитов использовали растворы: KClO₄, NaClO₄, (CH₃)₄NClO₄, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ в ацетонитриле. Каждый из этих фоновых электролитов можно использовать для количественного определения витамина, однако оптимальным фоном является раствор NaClO₄ в ацетонитриле. Линейная зависимость между током окисления и концентрацией витамина Е в растворе наблюдалась в диапазоне концентраций от 2,0 до 20,0 мг/л. Потенциал анодного пика находится в диапазоне потенциалов от +1,3 до +1,8 В относительно ртутного электрода сравнения.

Сущность методики определения α-токоферола ацетата в биологически активных добавках (БАД) состоит в

Обобщение данных по оценке показателя правильности методом сравнения с образцами для аттестации и методом добавок

Определяемый компонент	Метод сравнения с образцами для аттестации			Метод добавок		
	введено, мг/г	найденно, мг/г	средний результат анализа пробы без добавки, мг/г	введенная добавка, мг/г	средний результат анализа пробы с добавкой, мг/г	найденная добавка, мг/г
Витамин С	15,00	14,9 ± 0,30	11,95	40,00	49,28	37,3 ± 4,2
	50,00	51,8 ± 4,3	55,62	50,00	102,79	47,2 ± 5,8
Витамин В ₁	0,4000	0,421 ± 0,038	0,32	0,50	0,81	0,49 ± 0,04
	5,00	4,96 ± 0,80	4,21	5,00	9,13	4,92 ± 0,52
Витамин В ₂	0,35	0,35 ± 0,08	0,33	1,0	1,29	0,96 ± 0,08
	2,40	2,47 ± 0,22	1,02	0,5	1,543	0,51 ± 0,06
Витамин Е	6,00	6,56 ± 0,71	2,57	2,5	5,10	2,53 ± 0,26
	10,00	9,4 ± 0,9	8,22	8,0	16,17	7,95 ± 0,81
Кверцетин	1,0	0,87 ± 0,22	1,53	2,00	3,68	2,13 ± 0,24
	14,0	13,7 ± 0,8	20,0	40,0	59,1	39,1 ± 4,3

извлечении витамина Е из пробы (навеской 1,0 – 2,0 г) путем экстракции его хлороформом в аппарате Сокслета [15] с последующим вольтамперометрическим определением массовой концентрации витамина Е методом дифференциальной анодной вольтамперометрии.

Разработка и метрологическая аттестация методик количественного химического анализа различных проб на содержание витаминов и флавоноидов вольтамперометрическим методом проведена аккредитованной научно-исследовательской лабораторией микропримесей, метрологической службой Томского политехнического университета и ООО ВМПФ “ЮМХ” (Томск). Оценку характеристики систематической составляющей погрешности (показатель правильности) проводили с использованием образцов для аттестации и методом добавок определяемого вещества в пробу.

В настоящее время в России не существует ГСО биологически активных добавок с аттестованными значениями концентрации витаминов В₁, В₂, С, Е и кверцетина в них. Поэтому при использовании образцов для оценки характеристик погрешности образцами служили пробы реальных биологически активных добавок, в которых отсутствовали данные компоненты или их содержание было мало, с добавками аттестованных смесей витаминов В₁, В₂, С, Е и кверцетина. Добавка аттестованной смеси вводилась в пробу до стадии пробоподготовки. Пробы с точно введенной аттестованной смесью витаминов В₁, В₂, С, Е и кверцетина служили образцами для аттестации.

Для оценивания характеристик погрешности с применением метода добавок использовали образцы проб без добавки и проб с добавками аттестованной смеси витаминов В₁, В₂, С, Е и кверцетина. Некоторые данные по оценке показателей правильности приведены в таблице.

По разработанным методикам проведен анализ различных проб БАД: “Многолет”, “Гастрокалм”, “Кальций Макс”, “Бурдок С”, “Формула женщины”, “Ламинария”, “Дискавери”, “Скрин Лайн”, “Гепатон” и др. Содержание витаминов и флавоноидов в них варьировалось в следующих диапазонах: витамин С — от 1,0 до 20,0 масс. %, витамин В₁ — от 0,005 до 1,0 масс. %, витамин В₂ — от 0,01 до 0,3 масс. %, витамин Е — от 2,0 до 30,0 масс. %, кверцетин — от 0,01 до 15,0 масс. %. Приписанные метрологические характеристики относительной погрешности методики: граница относительной погрешности — 25 %; предел воспроизводимости — 28 %; предел сходимости — 22 %.

Выполненные исследования расширяют возможности использования вольтамперометрического метода для количественного определения сложных органических ве-

ществ (витаминов и флавоноидов), позволяют проводить оперативный контроль качества биологически активных добавок с высокой чувствительностью. При этом анализ значительно удешевляется за счет сокращения числа используемых реактивов, не требуется применение дефицитных и дорогостоящих веществ.

Разработанные методики количественного химического анализа проб БАД на содержание органических веществ экспрессны и позволяют проводить определение в мутных и окрашенных средах без отделения пигментов. Время анализа с учетом пробоподготовки не превышает 2 ч. Установленные оптимальные условия проведения электродного процесса автоматизированы и программно обеспечены.

Предложенные способы могут быть применены при анализе следовых количеств витаминов и флавоноидов как в чистых растворах, так и для анализа сложных по составу растительных экстрактов лекарственных форм, фармакологических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Тутельян, Б. П. Суханов, А. Н. Австриевских и др., *Биологически активные добавки в питании человека*, Томск (1999).
2. Сан Пин 2.3.2.1078-01, *Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов*, Москва (2001).
3. В. М. Березовский, *Химия витаминов*, Москва (1959).
4. М. П. Григорьева, Е. Н. Степанова, *Вопросы питания*, 1, 59 – 63 (1979).
5. С. В. Ульянова, А. М. Шавлинский, С. Н. Морев и др., *Фармация*, 42(3), 60 – 62 (1993).
6. О. А. Карелина, *Гигиена и санитария*, 4, 42 – 45 (1986).
7. ГОСТ 25999 – 83. Москва (1984).
8. С. В. Ульянова, А. Н. Шавлинский, С. Н. Морев и др., *Фармация*, 42(3), 50 – 51 (1993).
9. ФС 42-2192-93 Раствор α -токоферола ацетата (витамина Е-ацетата) 5 %, 10 % и 30 % в масле для инъекций.
10. С. С. Прохвятилова, *Фармация*, 3, 41 – 44 (1998).
11. И. Э. Крузе, *Фармация*, 4, 59 – 62 (1969).
12. С. П. Мискиджян, Л. П. Кравченко, *Полярграфия лекарственных препаратов*, Наукова думка, Киев (1976).
13. Н. К. Надилов, Г. М. Сансербаева, М. Ж. Журинов и др., *Электрохимическое исследование α -токоферола*, Чимкент (1986).
14. Патент РФ 2180747, Способ количественного определения витамина Е (α -токоферола ацетата) методом дифференциальной вольтамперометрии.
15. П. И. Воскресенский, *Техника лабораторных работ*, Москва (1964).

Поступила 16.03.04.

THE VOLTAMMERIC QUALITY CONTROL OF BIOACTIVE ADDITIVES. DETERMINATION OF В₁, В₂, С, Е VITAMINS AND QUERCETIN

Slepchenko G. B., Anysimova L. S., Slipchenko V. F., Mikheyeva E. V., Pickula N. P.

Tomsky Polytechnic University, Russia

The express voltammetric procedures of the determination of the water-soluble vitamins C, В₁, В₂, fat-soluble vitamin E (α -tocopherol acetate) and quercetin in bioactive additives have been developed. The systematic error component was evaluated with using certified reference materials and by recovery tests. The full analysis time (with probe treatment) did not exceed 2 hours. Voltammetric determinations in optimal conditions were computerized and the appropriate software have been designed.