

УДК 543.253

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ГРУДНОМ МОЛОКЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В

Г.Б. Слепченко, О.А. Мартынюк, О.В. Шелеметьева*

Томский политехнический университет

*ООО «Артлайф», г. Томск

E-mail: microlab@tpu.ru

Проведена разработка методик количественного химического анализа грудного молока на содержание витаминов группы В методами инверсионной вольтамперометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Показаны достоинства и недостатки этих методов и возможности их дальнейшего применения в аналитических и испытательных лабораториях и медицинских центрах.

Содержание витаминов в молоке рассматривается как неинвазивный метод диагностики гиповитаминозных состояний кормящих матерей. Синергичными, т. е. усиливающими действие друг друга, являются витамины группы В. Совместное действие этих витаминов создает эффект, который не может быть достигнут действием каждого из них. Витамин В₂ (рибофлавин) участвует во многих процессах обмена веществ, функционировании нервной, пищеварительной, сердечно-сосудистых систем, печени, в работе пищеварительного тракта, кроветворении. Выявлен синергизм витамина В₂ с цинком, селеном. Также с уменьшением рибофлавина снижается лактация. Витамин В₁ (тиамин) участвует в углеводном и энергетическом обменах, необходим для функционирования нервной системы. Установлено взаимодействие между витаминами С, В₁ и В₂. При недостатке витамина В₂ снижается уровень витаминов С и В₁ в тканях [1].

На сегодняшний день существуют различные способы определения концентрации рибофлавина. Для определения суммарного содержания рибофлавина и его коферментных форм в биологических объектах используют микробиологические методы, основанные на измерении скорости размножения *Lactobacillus casei* или продуцирования им молочной кислоты. В относительно концентрированных чистых растворах содержание рибофлавина можно определить спектрофотометрически или флуориметрически по интенсивности свечения рибофлавина или продукта его фотолиза [2]. Эти методы на два порядка чувствительнее спектрофотометрических и широко используются для определения витамина В₂ в жидкостях (крови, урине) и тканях организма.

Для обнаружения тиамин используют химические методы, основанные на цветных реакциях, характерных для специфических группировок, входящих в витамин. Нередко для количественного анализа пользуются титриметрическими методами анализа. Чувствительность таких методов невелика, зачастую они использовались для качественного определения витамина в различных веществах и биологических жидкостях. Широко используют оптические методы обнаружения витамина, например, флуориметрический. Эти методы недостаточно селективны, трудоемки и требуют больших затрат времени, реактивов, содержат большое число вспомогательных операций.

Интенсивное развитие метода ВЭЖХ расширило аналитические возможности определения водорастворимых витаминов в различных объектах. Для увеличения чувствительности определения витаминов используют УФ, флуориметрическое и электрохимическое детектирование с фотодиодной матрицей [3]. Необходимая подготовка пробы образца весьма проста относительно других методов, что связано прежде всего с исключительной универсальностью, высокой эффективностью разделения, благоприятными условиями анализа (низкая температура, инертный растворитель, отсутствие контакта с кислородом).

Для определения витаминов в настоящее время также успешно применяются электрохимические методы анализа, т. к. они отвечают современным требованиям контроля качества пищевых продуктов, лекарственных и фармацевтических препаратов, биологических и природных объектов. Инверсионно-вольтамперометрический способ определения витамина В₂ на стеклоуглеродном электроде (СУЭ) применяли при анализе пищевых продуктов, однако для экспрессного определения водорастворимых витаминов в грудном молоке данный способ не применялся.

На данный момент актуален вопрос о контроле содержания витаминов группы В в грудном молоке. Целями наших исследований стали разработка методик количественного химического анализа содержания водорастворимых витаминов группы В в грудном молоке с помощью методов инверсионной вольтамперометрии (ИВ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а также проведение сравнительного анализа результатов, полученных этими методами. Применение именно этих методов связано с их высокой чувствительностью, что не маловажно для анализа биологических объектов, и широкой распространенностью в современных лабораториях.

Экспериментальная часть

Метод ИВ

Измерения проводили с использованием индикаторного стеклоуглеродного электрода (для витамина В₂) и ртутно-пленочного (для витамина В₁), электродом сравнения служил насыщенный насыщенный хлоридсеребряный электрод (нас.х.с.).

Кислород из раствора удаляли током азота. Вольтамперограммы регистрировали на вольтамперометрическом комплексе СТА [4].

Процесс электрохимического окисления витамина В₂ проводили в растворе соляной кислоты 0,01 моль/л при потенциале, равном $-(0,2...0,15)$ В относительно нас.х.э. Все измерения – при температуре 300 К.

Процесс вольтамперометрического восстановления витамина В₁ проводили в растворе двузамещенного гидрофосфата натрия 0,1 моль/л (о.с.ч.) на индикаторном ртутно-пленочном электроде при потенциале $-(1,2...1,4)$ В относительно нас.х.э. Регистрировали аналитический сигнал на вольтамперограмме, используя вольтамперометрический комплекс СТА в дифференциальном режиме записи вольтамперограмм.

Основной раствор, содержащий 100,0 мг/л витамина В₂, готовили растворением навески сухого порошка рибофлавина (о.с.ч.) в 0,1 М растворе гидроксида натрия, перемешиванием и последующим доведением объема до метки бидистиллированной водой. Рабочие растворы более низкой концентрации готовили разбавлением исходных в бидистиллированной воде по общепринятой методике.

Основной раствор, содержащий 1000,0 мг/л витамина В₁, готовили растворением навески сухого порошка тиамин (о.с.ч.) в 0,1 М растворе соляной кислоты, перемешиванием и последующим доведением объема до метки бидистиллированной водой. Рабочие растворы более низкой концентрации готовили разбавлением исходных в бидистиллированной воде по общепринятой методике.

Раствор фонового электролита для рибофлавина готовили разбавлением исходной концентрированной соляной кислоты в бидистиллированной воде до концентрации 0,01 моль/л.

Раствор фонового электролита для тиамин готовили растворением навески двузамещенного натрия фосфорнокислого (о.с.ч.) в дистиллированной воде.

Метод ВЭЖХ

Анализы проводили на жидкостном хроматографе фирмы «Waters» с использованием стальных колонок размером 3,9×150 мм, заполненных обращено-фазным сорбентом Symmetry C₁₈ с размером частиц 5 мкм. В качестве элюента (подвижной фазы) выбрана смесь водных растворов гептансульфоната натрия и калия фосфорнокислого однозамещенного. Оптимальное значение величины pH устанавливали с помощью ортофосфорной кислоты до значения 2,5...3,0. Объем вводимой пробы 20 мкл, скорость потока подвижной фазы – 1 см³/мин, температура термостата – 30 °С, детектирование проводилось с использованием детектора с фотодиодной матрицей в диапазоне длин волн 200...400 нм [5].

Результаты и обсуждение

Независимо от поставленной задачи, подготовка пробы к анализу является начальным и одним из самых ответственных этапов любой методики.

Нами предложен алгоритм пробоподготовки грудного молока для хроматографического и инверсионно-вольтамперометрического определения водорастворимых витаминов группы В.

Пробоподготовка в методе ИВ (рис. 1) состояла из освобождения от белковых примесей посредством кислотного гидролиза 0,1 М HCl с последующим осаждением белка хлоридом марганца из гидролизата при pH 4,7...5,1, что соответствует изоэлектрической точке белка. После отделения осадка центрифугированием (6000 об/мин), проводили фильтрацию раствора через бумажный фильтр «синяя лента» с последующим вольтамперометрическим определением витаминов В₁ и В₂. Схема пробоподготовки грудного молока в методе ИВ представлена на рис. 1. Пробоподготовка по данной схеме позволяет из одной пробы брать аликвоту на разные витамины, что существенно сокращает время анализа по сравнению с аттестованными методиками по определению витаминов группы В в детском питании [6, 7].

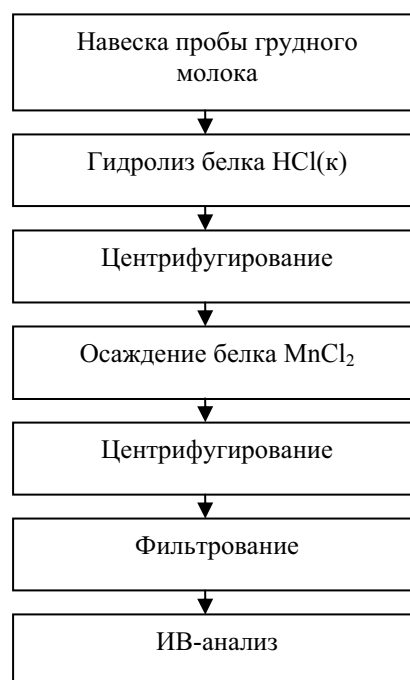


Рис. 1. Схема пробоподготовки грудного молока в методе ИВ

Методика определения рибофлавина и тиамин в грудном молоке методом ИВ

Пробу грудного молока объемом 3,0 мл, помещают в центрифужную пробирку, приливают 0,1 мл конц. HCl и центрифугируют в течение 20 мин при скорости 6000 об/мин. К центрифугату добавляют 1...2 г (NH₄)₂SO₄, отстаивают 5 мин., затем вновь центрифугируют в течение 20 мин. при скорости

6000 об/мин. Центрифугат фильтруют через двойной бумажный фильтр «синяя лента». Полученный фильтрат является подготовленной пробой. Для анализа берут аликвоту пробы 0,1 мл.

В чистый кварцевый стаканчик вносят 10,0 мл раствора фонового электролита 0,01 М HCl (для витамина B₂) или 10,0 мл 0,1 М двузамещенного натрия фосфорнокислого (для витамина B₁) и помещают в электрохимическую ячейку вольтамперометрического анализатора. Опускают в раствор электроды и регистрируют анодную вольтамперограмму в дифференциальном режиме. Вносят аликвоту подготовленной для анализа пробы грудного молока и регистрируют вольтамперограмму в тех же условиях. Измеряют высоту анодного пика при (0,2...0,3) В (для витамина B₂) или при -(1,2...1,4) В (для витамина B₁). Вносят добавку аттестованной смеси определяемого витамина в таком объеме, чтобы высота пика на вольтамперограмме увеличилась примерно в два раза, регистрируют вольтамперограмму в тех же условиях. Находят содержание витамина общепринятым способом. Все измерения проводят при комнатной температуре.

Пробоподготовка грудного молока в методе ВЭЖХ (рис. 2) состояла из центрифугирования и дальнейшего фильтрования пробы. Определение витаминов B₁ и B₂ проводят в течение одного анализа. Схема пробоподготовки грудного молока в методе ВЭЖХ представлена на рис. 2.

Оптимальный объем пробы, достаточный для определения витаминов, составляет 1,5...2,0 мл.

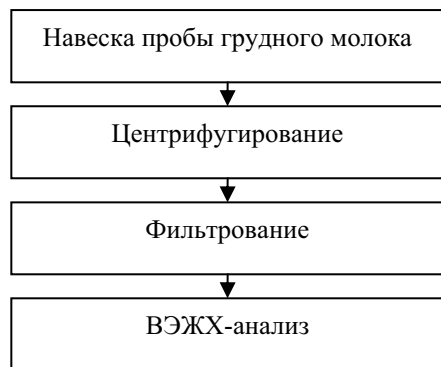


Рис. 2. Схема пробоподготовки грудного молока в методе ВЭЖХ

Методика определения витаминов B₁ и B₂ методом ВЭЖХ

Пробоподготовка состояла из центрифугирования образца грудного молока при 10000 об/мин и дальнейшего фильтрования пробы через фильтр «синяя лента». Для анализа на жидкостном хроматографе было взято 1,5 см³ фильтрата.

Объем вводимой пробы 20 мкл, скорость потока подвижной фазы – 1 см³/мин, температура термостата – 30 °С, детектирование проводилось с использованием детектора с фотодиодной матрицей в диапазоне длин волн 200...400 нм.

Правильность разработанной методики была подтверждена сравнением с методом «введено-найдено» [8]; результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты вольтамперометрического определения витамина B₂ в грудном молоке методом «введено-найдено»

Анализируемая проба	Результат анализа пробы, мг/кг	Введено, мг/кг	Результат анализа пробы с добавкой, мг/кг	Найдено, мг/кг
1	0,37±0,1	0,1	0,54±0,16	0,16±0,02
		0,5	0,79±0,24	0,41±0,08
		1,0	1,3±0,39	0,92±0,14
2	0,43±0,09	0,1	0,52±0,14	0,09±0,01
		0,5	0,93±0,26	0,50±0,11
		1,0	1,41±0,42	0,98±0,16
3	0,62±0,12	0,1	0,71±0,21	0,09±0,01
		0,5	1,11±0,32	0,49±0,08
		1,0	1,65±0,35	1,03±0,17

Нами был проведен сравнительный анализ результатов, полученных двумя методами (табл. 2).

Таблица 2. Результаты определения водорастворимых витаминов в грудном молоке различными методами, мг/л

Проба	Метод ИВ		Метод ВЭЖХ	
	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂
1	2,2±0,66	0,43±0,13	1,98±0,39	0,37±0,07
2	1,29±0,39	0,56±0,17	1,35±0,27	0,62±0,12
3	1,56±0,47	0,37±0,11	1,64±0,32	0,43±0,09

Как видно из приведенных в таблице данных, результаты содержания водорастворимых витаминов группы В, определенных разными методами, хорошо воспроизводимы и находятся в пределах погрешности данных методик.

Таблица 3. Сравнение методик КХА грудного молока на определение водорастворимых витаминов группы В

Параметры	ИВ	ВЭЖХ
Диапазон определяемых концентраций, мг/л	0,01...5,0	0,005...5,0
Время анализа, ч	0,5...1	1...2
Реактивы	Соляная кислота (к), двузамещенный гидрофосфат натрия, 0,01 М соляная кислота, гидроксид натрия	Гептасульфат Na, калий фосфорнокисл. однозамещ., ацетонитрил, ортофосфорная кислота
Используемый анализатор и стоимость	Вольтамперометрический анализатор (40–80 тыс. р)	Хроматограф для ВЭЖХ (400–1500 тыс. р)
Погрешность, отн. %	25	20

При сравнении разработанных методик можно сделать вывод о применимости их с целью контроля содержания водорастворимых витаминов группы В в аналитических лабораториях и центрах медицинских учреждений. Метод ИВ по сравнению с методом ВЭЖХ (табл. 3) более экспрессен, количество используемых реактивов минимально, стоимость приборов невысокая.

Методика количественного химического анализа грудного молока на содержание витаминов В₁ и В₂ методом ИВ прошла метрологическую аттестацию и находится на стадии согласования и внесения в Федеральный Реестр методик выполнения измерений, применяемых в сферах распространения государственного метрологического контроля.

Выводы

1. Разработаны методики количественного химического анализа грудного молока на содержание ви-

таминов В₁ и В₂ методами инверсионной вольтамперометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. ИВ-методика метрологически аттестована. Результаты анализа на содержание витаминов сопоставимы, и отвечают метрологическим показателям межлабораторных испытаний.

2. При сравнении разработанных методик выявлено преимущество метода ИВ по таким показателям, как время анализа (сокращено в два раза), количество используемых реактивов и стоимость оборудования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коденцова В.М., Вржесинская О.А., Лукоянова О.Л. Витамины в питании кормящей женщины и ее ребенка // Гинекология. – 2002. – № 4. – С. 56–58.
2. Nehderleiter J.A., Hystop R.M. The analysis of riboflavin in urine using fluorescence // J. Chem. Educ. – 1996. – V. 73. – № 6. – P. 563–564.
3. Amin M., Rresch J. High-performance liquid chromatography of water-soluble vitamins. Simultaneous determination of vitamins В₁, В₂, В₆ and В₁₂ in pharmaceutical preparations // J. Chromatogr. – 1987. – V. 13. – № 7. – P. 448–453.
4. ТУ 4215-001-20694097. Комплекс аналитический вольтамперометрический СТА. Технические условия.
5. US.C.31.004.A № 12656. Хроматограф жидкостной. Сертификат об утверждении средств измерений.
6. МУ 08-47/144. Продукты детского питания, соки, фрукты, ягоды и витаминизированные препараты. Вольтамперометрическое определение массовой концентрации витамина В₂. – 2004.
7. МУ 08-47/164. Овощи, фрукты, ягоды и продукты их переработки, продукты детского питания. Вольтамперометрический метод определения массовой концентрации витамина В₁. – 2005.
8. РМГ 61-2003. ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. – 2003.

Поступила 04.03.2008 г.

УДК 543.544.45

ТВЕРДОФАЗНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ ТОКОФЕРОЛА АЦЕТАТА НА СИЛИКАГЕЛЬ, МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АЦЕТИЛАЦЕТОНАТОМ НИКЕЛЯ

А.Г. Кузьмина, М.А. Гавриленко, Ж.В. Малышева, И.И. Устименко

Томский государственный университет
E-mail: gavrilenko@mail.tsu.ru

Показана возможность концентрирования токоферола ацетата в присутствии других органических молекул на привитый к силикагелю слой ацетилацетоната никеля. Определены оптимальные условия концентрирования и последующей десорбции. Приведены результаты определения витамина Е в поливитаминных препаратах.

Аналитические методы детектирования низких концентраций витаминов в природных объектах и пищевой продукции требуют специальной пробоподготовки для минимизации влияния мешающих веществ и концентрирования аналита. Процедура твердофазной экстракции требуется для повышения точности и предела хроматографического определения витаминов в молоке [1], биологических жидкостях [2, 3] и растительных экстрактах [4–6]. К сорбентам для твердофазной экстракции предъявляется ряд требований, таких как достаточная сорбционная емкость, селективность, химическая и механическая устойчивость, индифферентность по отношению к растворителю и возможность полной десорбции сорбированного вещества.

Сорбционная емкость используемых в настоящее время сорбентов достаточно велика для полного извлечения целевого вещества, поэтому основным параметром выбора становится селективность, которая может быть достигнута химической, физической или комбинированным модифицированием поверхности основы [7]. В числе модификаторов могут быть использованы комплексы металлов, жидкие кристаллы, макрохелаты или другие металлорганические соединения в виде адсорбционных слоев или в составе комбинированных фаз с полимерами [8–12].

В связи с этим, актуальной проблемой остается поиск и целенаправленное создание модифицированных сорбентов для избирательной твердофазной