

СОВМЕСТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В И С

Дерябина В.И., Михеева Е.В., Слепченко Г.Б., Щукина Т.И.

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Томск, пр. Ленина, 30, e-mail: microlab@tpu.ru

Проведены исследования вольтамперометрического поведения водорастворимых витаминов группы В и С на стеклоуглеродном электроде при их совместном присутствии. Наибольшая чувствительность определения и хорошая воспроизводимость аналитических сигналов для всех трех витаминов получена на стеклоуглеродном электроде в растворе натрия гидротартрата. На модельных смесях изучено взаимное влияние водорастворимых витаминов группы В и С. Установлено, что в диапазоне их определяемых содержаний от 1,0 до 60 мг/дм³ стократный избыток витамина С не оказывает влияние на аналитические сигналы витаминов В₂ и В₆. На основании полученных результатов предложена методика анализа кормов и кормовых добавок на содержание витаминов методом дифференциальной вольтамперометрии. Методика проста в исполнении, не требует затрат, позволяет анализировать группу водорастворимых витаминов в следующих диапазонах концентраций, мг/кг: витамин В₂ от 1,0 до 60, витамина В₆ от 1,0 до 80 и витамина С от 0,5 до 100 (S_r не более 25 %).

Ключевые слова: методика, вольтамперометрия, витамины В₂, В₆, С.

JOINT DEFINITION OF WATER-SOLUBLE VITAMINS GROUPS B AND C

Deryabina V.I., Mikheeva E.V., Slepchenko G.B., Shchukina T.I.

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia (Lenina Avenue, 30, 634050, Tomsk), mail: microlab@tpu.ru

Simultaneous voltammetric determination of water soluble vitamins groups B and C. The investigations on the choice of working conditions of simultaneous electrochemical determination of water soluble vitamins groups B and C. It was found in the range of determined concentration from 10 to 60 mg/dm³ hundredfold excess of vitamin C doesn't influence the analytical signals of vitamins B₂ and B₆. Maximal sensitivity and good reproducibility of determination have been obtained at glass carbon electrode in ground solution of sodium hydrotartrate. The mutual influence of vitamins was studied on model mixtures. Based on results involved the method of analysis of feeds and feed supplements by differential voltammetry have been proved. The methods is simple in fulfillment and low-costing, allows to analyses group of water soluble vitamins in the following concentration ranges: vitamin B₂ from 0,5 to 60, vitamin B₆ from 1,0 to 80 and C from 0,5 to 100 mg/kg (S_r is not more 25 %).

Keywords: technique, voltammetry, water soluble, vitamins groups, vitamins В₂, В₆, С.

В настоящее время потребительский рынок насыщен большим ассортиментом витаминизированных препаратов для животных, рецептура которых содержит несколько витаминов, чаще всего витамины С, В₂ и В₆. Эти витамины представляют собой биологически активные органические соединения разнообразной химической природы, недостаток или избыток которых в организме животного одинаково вредно, так как может вызвать глубокие нарушения различных его функций.

Оптимальной формой лабораторного контроля качества является система планового регулярного слежения за содержанием витаминов с компьютерной обработкой результатов анализа. Важнейшее условие оптимизации деятельности лабораторной службы – наличие

специфических, хорошо воспроизводимых, доступных методов, позволяющих проводить совместное определение анализируемых компонентов.

В настоящее время для анализа витаминов С, В₂ и В₆ в аналитических лабораториях используют в основном оптические и хроматографические методы анализа [1,3-5,7]. Среди электрохимических методов, для определения водорастворимых витаминов успешно применяют методы вольтамперометрии (ВА) [2,6]. Методы ВА довольно перспективны, так как сочетают высокие информационные возможности и простоту процесса измерения сигнала с невысокой стоимостью анализа и оборудования. К сожалению, предлагаемые аттестованные ВА-методики позволяют определять каждый витамин отдельно.

Цель работы заключалась в исследовании совместного вольтамперометрического поведения водорастворимых витаминов С, В₂ и В₆, выборе их рабочих условий и разработке методики анализа кормов и кормовых добавок на содержание витаминов методом дифференциальной вольтамперометрии.

Приборы и реактивы. Вольтамперометрические измерения проводили на компьютеризированном анализаторе «СТА» (ООО «ИТМ», г. Томск) в трехэлектродной системе. Индикаторным электродом служил стеклоуглеродный электрод (СУЭ), графитовый и углеситалловый, вспомогательными электродом сравнения – хлоридсеребряные в насыщенном растворе хлорида калия с сопротивлением не более 3,0 кОм.

Основные растворы, содержащие 1000,0 мг/дм³, водорастворимых витаминов В₆, С готовили растворением навесок фармакопейных препаратов сухих порошков, пиридоксина гидрохлорида, аскорбиновой кислоты (с содержанием основного вещества не менее 99,5 %) в бидистиллированной воде.

Основной раствор, содержащий 1000,0 мг/дм³ витамина В₂, готовили растворением навески фармакопейного препарата сухого порошка рибофлавина (с содержанием основного вещества не менее 99,5 %) в 10,0 см³ раствора NaOH концентрации 0,1 моль/дм³ и затем доводили до 100 см³ бидистиллированной водой.

Рабочие растворы – аттестованные смеси (АС) получали последовательным разбавлением в бидистиллированной воде основных растворов.

Растворы фоновых электролитов готовили растворением навески соответствующих солей (ч.д.а. или ос.ч.) в дистиллированной воде.

Массовую концентрацию витаминов рассчитывали методом добавок аттестованных смесей.

В качестве объектов анализа использовали витаминизированные корма для животных: БМВД «Pigimax№5220», ВМД «Хрюша» (ООО «Агровит»), Премикс ПКК1-2 (ЗАО «Витасоль», г. Боровск) и др.

Для совместного определения витаминов С, В₂ и В₆ предложен метод дифференциальной вольтамперометрии. Проведены исследования по выбору материала индикаторного электрода. В работе использовали графитовый электрод, пропитанный полиэтиленом с парафином в вакууме, стеклоуглеродный и углеситаловый электроды. Наибольшую чувствительность определения, низкое значение остаточного тока и хорошую воспроизводимость аналитических сигналов для всех трех витаминов наблюдали на стеклоуглеродном электроде, который и был выбран в качестве рабочего. К несомненным достоинствам стеклоуглеродных электродов следует отнести их налаженный промышленный выпуск, что не требует от исследователей собственных усилий по приготовлению электродов. Вольтамперограммы электроокисления витаминов С, В₂ и В₆ на СУЭ представлены на рисунке 1.

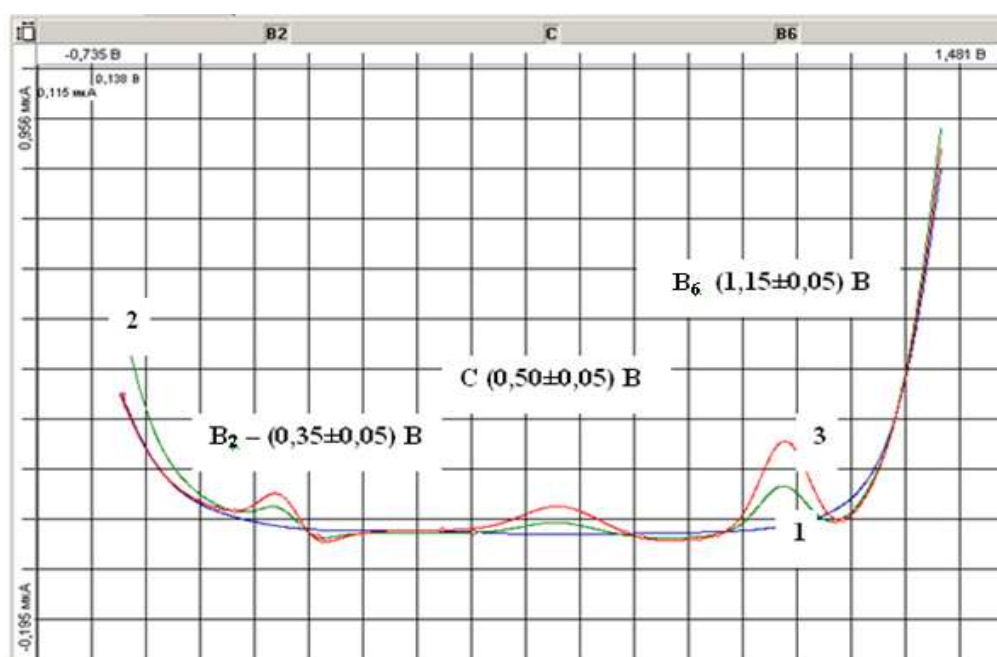


Рис.1. Вольтамперограммы окисления водорастворимых витаминов на СУЭ:

- 1 – фон 0,1 М NaC₄H₄O₆·H₂O;
- 2 – 2 мг/дм³ Вит В₂ + 2 мг/дм³ ВитВ₆ + 1 мг/дм³ Вит С;
- 3 – 4 мг/дм³ Вит В₂ + 4 мг/дм³ ВитВ₆ + 2 мг/дм³ Вит С.

$$E_{\text{э}} = -0,7 \text{ В}, \tau_{\text{э}} = 30 \text{ с}, w = 25 \text{ мВ/с.}$$

С целью выбора рабочего фонового электролита исследовали процесс электроокисления и восстановления исследуемых витаминов в 0,1 моль/дм³ растворах: (NH₄)₂SO₄, KCl, Na₃C₆H₅O₇, C₆H₈O₇·2HN₃, C₄H₅O₆Na·H₂O, C₄H₆O₆, C₆H₈O₇, в буферном растворе Бриттона – Робинсона и цитратно-фосфатных буферных смесях. Все перечисленные электролиты можно использовать для совместного количественного определения витаминов, однако рабочим фоновым электролитом был выбран 0,1 моль/дм³ раствор C₄H₅O₆Na·H₂O, на фоне которого регистрировались хорошо воспроизводимые пики

электроокисления витаминов С, В₂ и В₆ с хорошим диапазоном линейности градуировочных зависимостей. Кроме того, электролит 0,1 моль/дм³С₄Н₅О₆Na·Н₂О является хорошим высаливателем водорастворимых белков (рН раствора соответствует изоэлектрической точке гидролиза водорастворимых белков), мешающих экспрессному определению витаминов в витаминизированных подкормках и премиксах. Градуировочные графики зависимости величин тока электроокисления исследуемых витаминов представлены на рисунке 2.

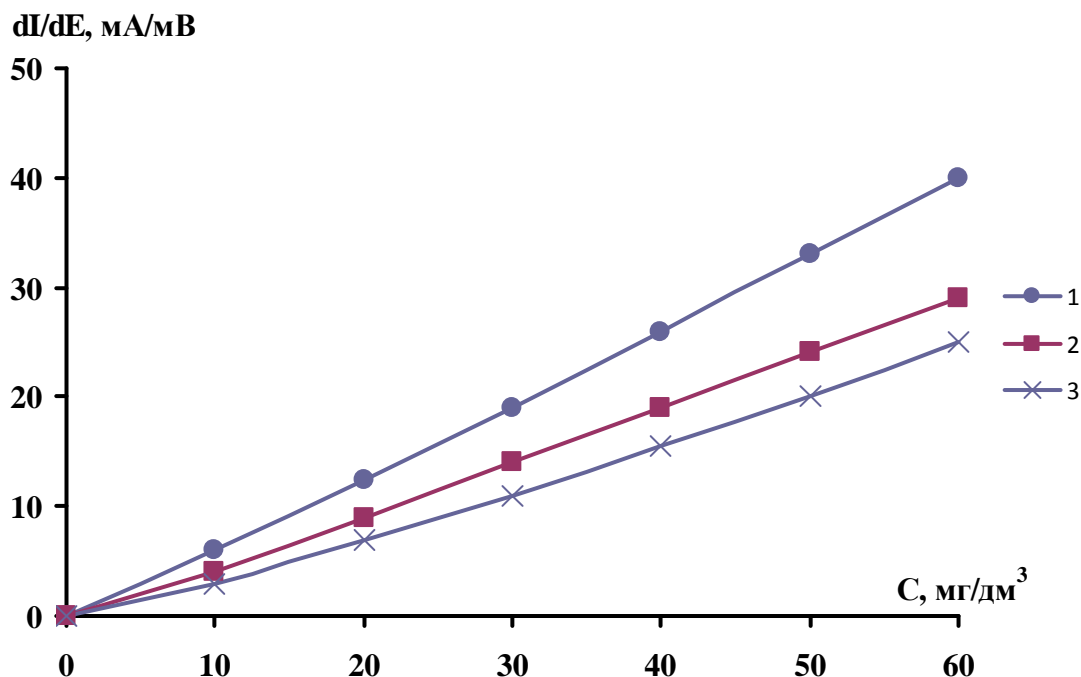


Рисунок 2. Градуировочные зависимости водорастворимых витаминов С (1), В₂ (2) и В₆(3)

фон 0,1 моль/дм³NaC₄H₄O₆·Н₂О; $\tau_{\text{э}} = 30\text{с}$; $w = 27\text{ мВ/с}$

1 – 5 мг/дм³ Вит С; 2– 5 мг/дм³ Вит В₂; 3 –5 мг/дм³ ВитВ₆

Из рисунка 2 следует, что линейная зависимость тока электроокисления витаминов сохраняется в широком диапазоне определяемых содержаний.

Для увеличения чувствительности определения применяли дифференциальный режим съемки вольтамперограмм. Существенным преимуществом такого вида съемки служит возможность получения четких пиков, облегчающих расшифровку вольтамперограмм и уменьшающих ошибку определения величины аналитического сигнала.

Изучено влияние развертки поляризующего напряжения на ток электроокисления исследуемых витаминов. Установлено, что с увеличением скорости развертки ток электроокисления витаминов увеличивается, однако при этом возрастает и остаточный ток. На основании полученных результатов выбраны рабочие скорости развертки потенциала, которые лежат в пределах от 20 до 30 мВ/с.

В современных компьютеризированных вольтамперометрических анализаторах реализованы различные способы регистрации вольтамперограмм. Исследования по выбору режима регистрации вольтамперограмм витаминов проводили при линейном и дифференциально-импульсном наложении потенциала. Параметры дифференциально-импульсного режима подобраны экспериментально и составляют: шаг развертки 3 мВ; амплитуда импульса 30 мВ; длительность импульса 40 мс. При таких условиях регистрируются вольтамперограммы исследуемых витаминов с четко выраженными максимумами и хорошей воспроизводимостью.

На основании проведенных исследований предложены рабочие условия совместного ВА-определения витаминов С, В₂ и В₆ (таблица 1).

Таблица 1. Рабочие условия одновременного ВА-определения витаминов В₂, С и В₆

Параметры	Значения параметров		
	В ₂	С	В ₆
Используемая система			
Электроды - индикаторный	3-х электродная СУЭ		
-сравнения /вспомогательный	ХСЭ/ ХСЭ		
Фоновый электролит	0,1 моль/дм ³ NaC ₄ H ₄ O ₆ ·H ₂ O		
Удаление кислорода	нет		
Потенциал накопления (Ен), В	- 0,7 ± 0,05		
Диапазон развёртки потенциалов (Ер), В	-0,7 до 1,2		
Скорость изменения потенциала (w), мВ/с	20 -30		
Режим регистрации	дифференциально-импульсный		
Потенциал пика (Еп), В	- 0,35± 0,05	0,5±0,05	1,10 ± 0,05

В реальных объектах максимальное соотношение витаминов группы В к витамину С, как правило, составляет 1:100. Нами изучено взаимное влияние витаминов В₂, В₆ и витамина С. В ходе исследований установлено, что в диапазоне концентраций от 1,0 до 60 мг/дм³ стократный избыток витамина С не оказывает влияния на аналитические сигналы витаминов В₂ и В₆.

На основании проведенных исследований разработана методика количественного химического анализа витаминизированных подкормок для животных на содержание витаминов С, В₂ и В₆.

Методика совместного определения витаминов С, В₂ и В₆ в витаминизированных подкормках для животных: навеску витаминизированной подкормки или премикса (0,5 – 1,0) г растворяют в воде, в результате чего витамины переходят в водную фазу. Затем смесь

фильтруют (центрифугируют), в полученном фильтрате определяют содержание водорастворимых витаминов С, В₂ и В₆ методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии.

Витаминизированные подкормки и премиксы представляют собой многокомпонентные сухие смеси. Кроме витаминов в них содержатся наполнители, антиоксиданты, эмульгаторы, минеральные и другие добавки, оказывающие негативное влияние на величину аналитического сигнала исследуемых витаминов. Поэтому в некоторых случаях необходимо удалить белковые фракции. Для этого в смесь добавляют осадитель (сульфат цинка) и после 30 мин экспозиции осадок отделяют, фильтрат анализируют.

Используя данную методику, проведен анализ реальных объектов, полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты ВА-определения витаминов (В₂, В₆, С), проверка правильности методом «введено-найденно», (P = 0,95, n =3)

Объект	Аналит	Содержание, г/кг		
		На упаковке производителя (в пробе)	Введено	Найдено
БМВД «Рiɡiтaх№5220» Украина	В ₂ , г/кг	38	Не введено	39 ± 4
			5,0	43 ± 4
	В ₆ , г/кг	16	Не введено	15 ± 2
			4,0	20 ± 2
ВМД «Хрюша» ООО «Агровит»	В ₂ , г/кг	0,2	Не введено	0,19 ± 0,04
			0,10	0,28 ± 0,05
	С, г/кг	10	Не введено	9,7 ± 1,4
			5,0	15 ± 2
Премикс ПКК1-2 ЗАО «Витасоль», г. Боровск	В ₂ , г/кг	0,3	Не введено	0,26 ± 0,05
			0,10	0,38 ± 0,07
	В ₆ , г/кг	0,2	Не введено	0,23 ± 0,05
			0,10	0,29 ± 0,06

Как видно из таблицы 2, полученные результаты согласуются с данными, заявленными производителями.

В ходе исследований определены нижние границы определяемых содержаний (С_н) и пределы обнаружения (С_{min,p}): для витамина С: С_н = 0,5 мг/дм³, С_{min,p} = 0,25 мг/дм³; для витаминов В₂ и В₆: С_н = 1,0 мг/дм³, С_{min,p} = 0,5 мг/дм³.

Предложенная методика проста в исполнении, не требует затрат, позволяет анализировать группу водорастворимых витаминов в следующих диапазонах концентраций, мг/кг: витамин В₂ от 1,0 до 60, витамина В₆ от 1,0 до 80 и витамина С от 0,5 до 100 (S_r не более 25 %).

Работа выполнена в рамках государственного задания «Наука» по теме 1.1317.2014.

Список литературы

1. Арбатский А.П. Определение витаминов в кормовых и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А.П. Арбатский, Г.Н. Афоньшин, В.М. Востоков // Журн. аналит. химии. – 2004. – Т. 59, № 12. – С. 1304–1307.
2. Боев А. С. Вольтамперометрическое определение форм витамина В₆ с помощью химически модифицированного фталоцианином кобальта электрода: автореф. дисс. ... канд. хим. наук. – Томск: Политехн, ун-т, 2008. – 21 с.
3. ГОСТ 31483-2012. Премиксы. Определение содержания витаминов: В₁ (тиаминхлорида), В₂ (рибофлавина), В₃ (пантотеновой кислоты), В₅ (никотиновой кислоты и никотинамида), В₆ (пиридоксина), В_с (фолиевой кислоты), С (аскорбиновой кислоты) методом капиллярного электрофореза. – введ. 2013–07–01. – М.: Стандартиформ, 2012. – 20 с.
4. Запорожец, О.А. Определение аскорбиновой кислоты методами молекулярной спектроскопии. Текст / О.А.Запорожец, Е.А.Крушинская // Журн. аналит. химии. – 2002. – Т. 57, № 4. – С. 343–354.
5. Коренман Я.И. Экстракционное разделение и спектрофотометрическое определение витаминов группы В в бинарных смесях. Текст /Я.И. Коренман, Н.Я. Мокшина, А.В. Зыков // Хим. технология. – 2010. – № 5. – С. 288–291.
6. ФР.1.31.2004.01071, МУ 08-47/141. Биологически активные добавки. Вольтамперометрический метод определения массовых концентраций витаминов С, В₁, В₂, Е и кверцетина. Свид. МВИ № 08-47/141 от 15.01.2004./ ГОУ ВПО «Томский политехнический университет». – Томск. – 57 с.
7. ФР.1.31.2011.11207. Методика измерений содержания свободных форм водорастворимых витаминов в премиксах, витаминных концентратах, смесях и добавках, в том числе жидких, методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105/105М». Дата свид. 26.09.2011/ ООО «Люмекс-маркетинг».

Рецензенты:

Полещук О.Х., д.х.н., профессор, зав. кафедрой Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Томский государственный педагогический университет», г. Томск.

Отмахов В.И., д.т.н., профессор кафедры аналитической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального

образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»,
г. Томск.