

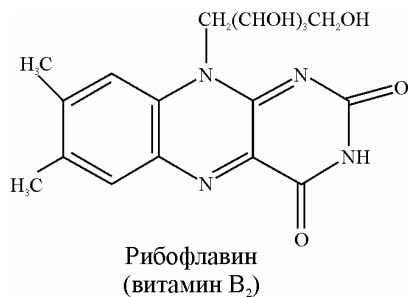
УДК 542.61

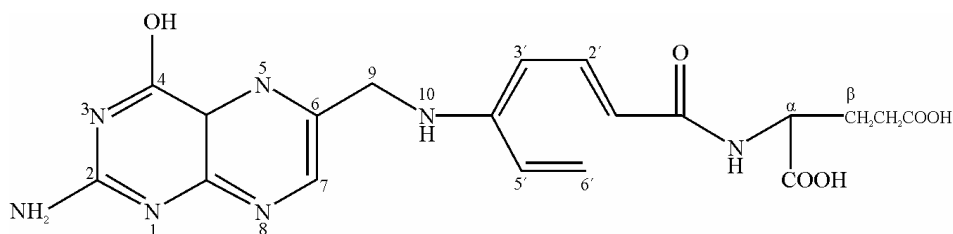
Е.М. РАХМАНЬКО, Е.И. ПОЛЯНСКИХ, О.В. ШУЛЯКОВСКАЯ

ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

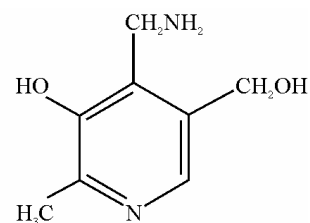
The regularities of distribution of group B vitamins (riboflavin, folic acid, pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamin) in the following systems: salt-water vitamins solutions (NaCl, Na₂SO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, KCl, K₂SO₄, CaCl₂) – lower aliphatic spirits were determined. It is shown that additions of sulfates lead to the increase of distribution coefficient (*D*) of the vitamins (in 3÷10 times). Additions of salts (KCl, NH₄Cl, NaCl) practically don't influence essentially and in case of riboflavin lead to the decrease of *D*. It was shown that *n*-butanol can be substituted for *n*-propanol and isopropanol which form stable extraction systems with saturated solution of (NH₄)₂SO₄. It allows to achieve the increase of distribution coefficient of riboflavin till 11,3÷11,8. The method for riboflavin determination in low riboflavin foodstuffs and the method for folic acid determination in fortified food products with the use of extraction were developed.

В настоящее время витамины группы В (В₂, В₆ и В₉) широко используются в пищевой промышленности для создания функциональных продуктов питания. В связи с этим актуальным направлением является разработка и совершенствование методик их определения, которые необходимы как для отработки технологического процесса производства, так и для госконтроля качества производимой продукции.





Фолиевая кислота
(витамин В₉)



Пиридоксамин
(витамин В₆)

Лимитирующей стадией в анализе витаминов группы В является пробоподготовка, которая включает выделение витаминов из сложной пищевой матрицы (кислотный, ферментативный гидролиз), очистку гидролизата и концентрирование аналита.

Одним из эффективных вариантов очистки от примесей и концентрирования аналита является экстракция. Обзор известных данных об экстракции указанных витаминов группы В позволяет сделать вывод о том, что систематического изучения экстракции этих витаминов не проводилось. Актуальными и малоисследованными остаются проблема выбора экстрагента для проведения экстракции витаминов группы В, расчет экстракционных характеристик, изучение влияния добавок солей на их высаливание в пробоподготовке. В качестве экстрагентов для выделения рассматриваемых витаминов целесообразно использовать полярные органические растворители – низшие алифатические спирты. Так как в структурных формулах витаминов присутствуют гидроксильные группы, то при экстракции алифатическими спиртами возможно образование ассоциатов по донорно-акцепторному механизму [1].

Так как ионизированные формы витаминов гидрофильны и практически не экстрагируются *n*-бутанолом, то необходимо уточнить диапазоны pH существования молекулярной формы. К сожалению, данные по константам протонирования и кислотной диссоциации (рК) малорастворимых в воде витаминов (рибофлавины и фолиевой кислоты) в разных источниках сильно отличаются. Видимо, это связано с тем, что при определении рК титрометрическим методом при изменении pH наблюдается выпадение осадка витамина. Поэтому интерес представляет определение рК указанных витаминов методом экстракции, в котором используются сильно разбавленные их водные растворы.

Экспериментальная часть

Эксперимент выполняли при постоянной концентрации витаминов. Изучалось распределение витаминов (рибофлавина, пиридоксина, пиридоксала, пиридоксамина, фолиевой кислоты) в системах водный раствор витамина с pH 0–13 – *n*-бутанол. В градуированные пробирки на 25 см³ помещали 10 см³ раствора витамина и столько же экстрагента.

В качестве высаливателей использовали следующие соли: Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂SO₄, KCl, NH₄Cl, NaCl, CaCl₂. Для проведения высаливательной экстракции в градуированные пробирки на 25 см³ помещали: 1 см³ водного раствора пиридоксина, пиридоксальгидрохлорида и пиридоксаминдигидрохлоридгидрата концентрацией 0,001 моль/дм³, 2 см³ раствора рибофлавина концентрацией 0,0002 моль/дм³ и 5 см³ фолиевой кислоты концентрацией 0,00004 моль/дм³. Далее в пробирки приливали 0–9 см³ раствора высаливателя и 0–9 см³ воды до доведения общего объема раствора витамина и высаливателя до 10 см³. Затем в пробирки приливали по 10 см³ экстрагента. Содержимое пробирок взбалтывали до достижения межфазного равновесия в течение 3–4 мин. Для разделения фаз система отстаивалась в течение 20 мин. После расслаивания измеряли соотношение объемов равновесных фаз, которые изменялись вследствие взаимной растворимости *n*-бутанола и воды. Затем производили отбор водно-солевой фазы, не допуская попадания органического растворителя в пробу. Концентрации витаминов определяли на спектрофотометре Cary 50 Scan по поглощению при 445 нм рибофлавина, 325 нм пиридоксина, 315 нм пиридоксала, 310 нм пиридоксамина и 280 нм фолиевой кислоты.

В работе рассчитывали следующие характеристики.

Коэффициент распределения *D*. Так как концентрация вещества в растворе пропорциональна оптической плотности раствора, то *D* рассчитывали по формуле

$$D = \frac{(A_0 - A) \cdot V_B}{A \cdot V_0}, \quad (1)$$

где *A*₀ и *A* – оптические плотности раствора до и после экстракции соответственно, *V*_в и *V*_о – объемы равновесных водной и органической фаз, см³.

Степень извлечения витаминов (R , %) находили по формуле

$$R = \frac{D}{(D + \frac{V_B}{V_0})} \cdot 100. \quad (2)$$

Результаты и их обсуждение

Рассмотрено влияние pH на экстракцию витаминов группы В *n*-бутанолом (рис. 1).

Из рис. 1 видно, что заметная экстрагируемость витаминов наблюдается в разных диапазонах pH, поскольку в этих интервалах pH витамины находятся в молекулярной форме, которая наиболее гидрофобна. Имеющиеся в литературе данные по рК витамина В₆ (пиридоксина, пиридоксаль и пиридоксамина) [2] соответствуют характеру влияния pH на их экстракцию. По снижению экстрагируемости (см. рис. 1) было рассчитано значение рК₁ рибофлавина, которое оказалось равным 0,9, что ниже (1,8) данных [3]. Рассчитанное значение рК₂ оказалось равным 10,1, что хорошо согласуется с литературными источниками: 9,69 [2], 10,2 [3]. В разных публикациях данные по рК фолиевой кислоты сильно различаются: 0,20; 1,5; 2,35 [4]; 4,65; 6,75; 9,00 [2]; 2,46; 5,47; 8,28 [5]. Значения констант протонирования и кислотной диссоциации фолиевой кислоты, рассчитанные по полученному графику (см. рис. 1), составляют 2,1 и 4,2. Установленное рК 4,2 соответствует диссоциации фолиевой кислоты по одной из карбоксильных групп, рК 2,1 соответствует протонированию азота в положении 1 или 10.

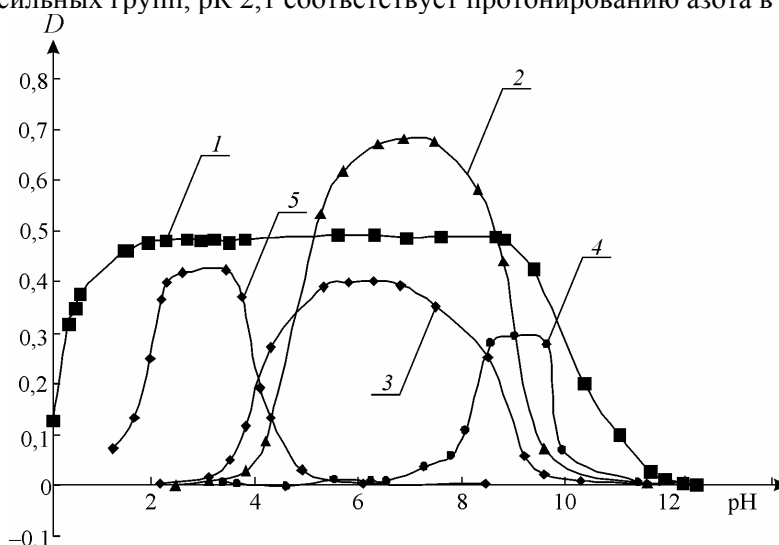


Рис. 1. Зависимость коэффициентов распределения витаминов между водной фазой и *n*-бутанолом от pH:

1 — рибофлавин, 2 — пиридоксин, 3 — пиридоксаль, 4 — пиридоксамин, 5 — фолиевая кислота

Рассчитаны коэффициенты распределения витаминов в системах водный раствор витамина — *n*-бутанол и степени извлечения (табл. 1).

Таблица 1

Коэффициенты распределения витаминов в системах водный раствор витамина — *n*-бутанол и степени их извлечения ($V_B/V_0 = 1,22$)

Витамины	Коэффициент распределения (D)	Степень извлечения (R , %)	Диапазон pH проведения экстракции
Рибофлавин	$0,45 \pm 0,05$	34,6	2÷9
Пиридоксин	$0,71 \pm 0,02$	45,5	6÷8
Пиридоксаль	$0,39 \pm 0,02$	31,5	5÷7
Пиридоксамин	$0,29 \pm 0,03$	25,4	8,5÷9,5
Фолиевая кислота	$0,40 \pm 0,05$	32,0	2÷4

Низкая экстрагируемость витаминов обусловлена наличием большого количества полярных групп: —ОН, —СООН, =СО, =NH, ≡N, —NH₂.

Установлена зависимость коэффициентов распределения рибофлавина от концентрации высаливателей (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что влияние солей на экстракцию рибофлавина неоднозначно. Сульфаты калия, натрия и аммония высаливают рибофлавин. Так, в случае 3 М раствора (NH₄)₂SO₄ значение коэффициента распределения составляет 4,1. Причем эффект высаливания одинаков для всех сульфатов и практически не зависит от природы катиона. Напротив, CaCl₂ всаливает рибофлавин, что наблюдается

и при экстракции других соединений [6, 7] и обусловлено участием атомов кислорода гидроксильных групп рибофлавина в сольватации катионов Ca^{2+} . Молекула рибофлавина содержит 4 гидроксильные и другие донорные группы, чем и объясняется эффект его всаливания. Необычным оказалось влияние добавок хлоридов калия, натрия и аммония, которые чаще всего используются как высаливатели полярных органических веществ, однако в случае рибофлавина их применение привело к обратному эффекту. Следует отметить, что эффект «всаливания» носит кажущийся характер, поскольку добавление NaCl , KCl , NH_4Cl со слабо гидратированными ионами приводит к уменьшению растворимости *n*-бутанола в воде, но при этом не происходит сильного структурирования водного раствора. Система становится более «чистой», и сродство полярной фазы к гидрофильным веществам (рибофлавину) увеличивается. Аналогично падает растворимость воды в бутаноле, что ведет к уменьшению сродства органической фазы к рибофлавину. Однако суммарный эффект «всаливания» незначителен.

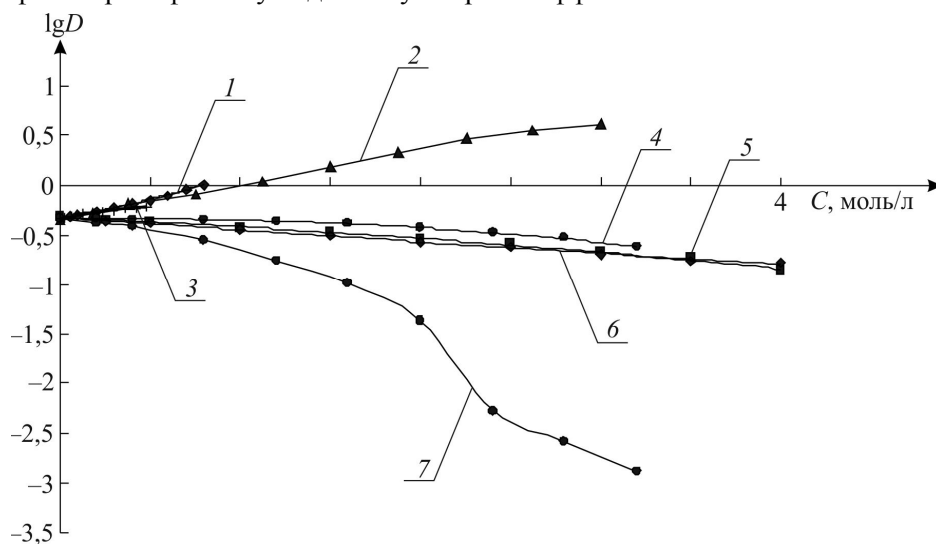


Рис. 2. Зависимость логарифмов коэффициентов распределения рибофлавина от концентрации высаливателя: 1 – Na_2SO_4 , 2 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 – K_2SO_4 , 4 – KCl , 5 – NH_4Cl , 6 – NaCl , 7 – CaCl_2

Установлена зависимость коэффициентов распределения пиридоксина от концентрации высаливателей (рис. 3).

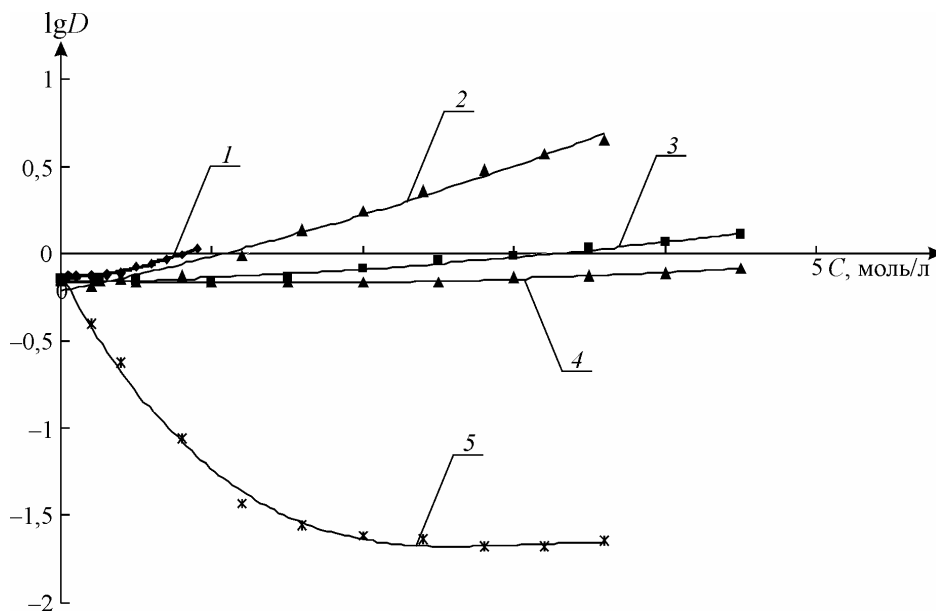


Рис. 3. Зависимость логарифмов коэффициентов распределения пиридоксина от концентрации высаливателя: 1 – Na_2SO_4 , 2 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 – NaCl , 4 – NH_4Cl , 5 – CaCl_2

Из рис. 3 видно, что общая картина влияния соли на экстракцию пиридоксина сходна с рибофлавином. Все сульфаты высаливают пиридоксин. Как и в случае рибофлавина, влияние катиона при этом незаметно. Хлорид кальция хорошо всаливает пиридоксин. Но степень снижения экстрагируе-

мости с ростом концентрации менее выражена. Минимальное значение коэффициента распределения достигает лишь 0,015, в то время как в случае рибофлавина оно составляет 0,001. Это может быть связано с тем, что в молекуле пиридоксина лишь две гидроксильные группы.

При этом влияние добавок хлоридов на экстрагируемость пиридоксина существенно отличается от описанного случая: отсутствует «всаливание» и наблюдается незначительное высаливание. Вероятно, это отличие обусловлено меньшим количеством гидрофильных групп в молекуле пиридоксина по сравнению с рибофлавином. Однако высаливающий эффект хлоридов незначителен, поэтому они малоперспективны в качестве высаливателей пиридоксина.

Изучена зависимость коэффициентов распределения фолиевой кислоты, пиридоксала, пиридоксамина от концентрации сульфата аммония (рис. 4).

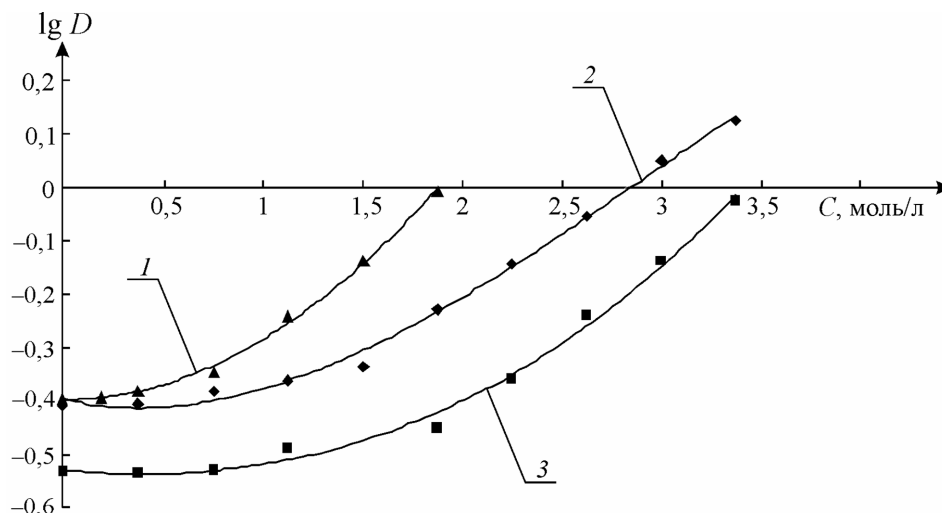


Рис. 4. Зависимость логарифмов коэффициентов распределения витаминов от концентрации сульфата аммония: 1 – фолиевая кислота, 2 – пиридоксаль, 3 – пиридоксамин

Из рис. 4 видно, что сульфат аммония обладает хорошим высаливающим эффектом и в случае этих витаминов. Установлено, что для высаливательной экстракции витаминов группы В целесообразнее использовать концентрированный раствор сульфата аммония. Лучшее высаливающее действие сульфатов по сравнению с хлоридами обусловлено тем, что сульфат представляет собой сильно гидратированный ион, который эффективно «сшивает» структуру водного раствора и высаливает гидрофобные участки молекул.

Преимуществом $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ является возможность создания экстракционных систем с более низкомолекулярными, чем *n*-бутанол, спиртами – изопропанолом и *n*-пропанолом (табл. 2).

Таблица 2

Коэффициенты распределения рибофлавина между насыщенным раствором сульфата аммония и низшими спиртами и степень его извлечения из водно-солевого раствора ($V_v/V_o = 4$)

Витамин	Показатель	<i>n</i> -Пропанол	Изопропанол	<i>n</i> -Бутанол
Рибофлавин	D	$11,8 \pm 0,9$	$11,3 \pm 0,8$	$7,0 \pm 0,6$
	$R, \%$	74,7	73,8	63,6

Изопропанол и *n*-пропанол образуют наиболее оптимальные экстракционные системы с сульфатом аммония по сравнению с *n*-бутанолом. Указанные спирты легколетучие, а экстракт может быть упарен, что весьма перспективно в аналитических целях и в дальнейшем использовалось нами для выделения и концентрирования рибофлавина из пищевых матриц.

Использование молекулярной экстракции для выделения витамина B_9 (фолиевой кислоты) из водных растворов малоэффективно в силу узкого диапазона существования молекулярной формы. Фолиевая кислота при $\text{pH} > 5$ существует в виде одно-, двух- и трехзарядного аниона, и для ее выделения из обогащенных пищевых продуктов и концентрирования целесообразно использовать твердофазную экстракцию на анионитах.

Применение молекулярной экстракции для одновременного выделения и концентрирования витаминов витамина B_6 из продуктов питания неэффективно, так как молекулярные формы данных витаминов существуют при разных pH , однако данное явление может быть использовано для их разделения при совместном присутствии в анализируемом растворе.

В продуктах с большим содержанием витамина В₂ и обогащенных рибофлавином пищевых продуктах возможно определение общего содержания витамина В₂ методом ВЭЖХ непосредственно после стадий кислотного, ферментативного гидролиз и очистки гидролизата. Для определения витамина В₂ в пищевых продуктах с низким его содержанием (некоторые овощи, соки, нектары) необходимо его концентрирование.

Авторами данной статьи разработана методика пробоподготовки пищевых продуктов с низким содержанием рибофлавина. К пробе (10 см³) с рН 5–6, прошедшей стадии кислотного, ферментативного гидролиз (37 °С, 14 ч) и очистки гидролизата, добавляют 6,5 г сульфата аммония. После полного растворения соли проводят трехкратную экстракцию рибофлавина изопропанолом (по 3 см³). Объемную изопропанольную фракцию осушают натрием сернокислым безводным, фильтруют, упаривают растворитель досуха. Сухой остаток растворяют в 1 см³ дистиллированной воды и фильтруют через фильтр Milipore. Полученную пробу анализируют на жидкостном хроматографе с флуоресцентным детектором. При использовании высаливательной экстракции извлечение рибофлавина из модельной среды составило 88÷92 % и относительное стандартное отклонение 11,5 %. Для учета потерь рибофлавина при проведении высаливательной экстракции рассчитан поправочный коэффициент $K = 1,1$. Проведение экстракционной пробоподготовки позволяет отделить рибофлавин от компонентов матрицы, а последующая отгонка растворителя – сконцентрировать рибофлавин, содержащийся в пробе, и тем самым увеличить по меньшей мере на порядок чувствительность метода определения по сравнению с прямым вводом пробы в ВЭЖХ-систему.

При изучении способов выделения витамина В₉ (фолиевой кислоты) обнаружено явление быстрого и эффективного ее поглощения из модельной среды анионитом ФИБАН А-6, разработанным в Институте физико-органической химии НАН Беларуси и содержащим сильноосновные и слабоосновные функциональные группы: $(C_3H_5O)(CH_3)_2N^+Cl^-$, $-N(CH_3)_2$. Степень извлечения фолиевой кислоты составила 92÷94 %. Данное явление использовалось для отделения фолиевой кислоты от компонентов матрицы и концентрирования при ее определении в обогащенных плодоовощных, хлебобулочных, молочных продуктах методом ВЭЖХ.

Нами разработана методика пробоподготовки обогащенных фолиевой кислотой плодоовощных, хлебобулочных и молочных продуктов. Анализируемый объект измельчают и выделяют фолиевую кислоту 0,01 М раствором NaOH. Очистку экстракта проводят при помощи центрифугирования и фильтрации. Осаждение молочных белков при определении фолиевой кислоты в обогащенных молочных продуктах осуществляют при помощи ацетонитрила. Затем фильтрат пропускают через колонку, заполненную волокнистым анионитом ФИБАН А-6. Фолиевую кислоту элюируют из колонки 15 % раствором NaCl с рН 9, далее проводят хроматографический анализ. Проведение пробоподготовки при определении фолиевой кислоты в обогащенных хлебобулочных и молочных продуктах с использованием волокнистого анионита позволяет очистить пробу от примесей и сконцентрировать фолиевую кислоту (в 7 раз).

* * *

Выявлены закономерности распределения витаминов группы В в системах водно-солевые растворы витаминов – низшие алифатические спирты, которые заключаются в различном влиянии соли на коэффициенты распределения витаминов. Установлено, что все сульфаты высаливают витамины, причем использование сульфата аммония в качестве высаливателя приводит к существенному возрастанию (3÷10 раз) коэффициентов распределения витаминов между водой и *n*-бутанолом. Добавки CaCl₂ высаливают рибофлавин и пиридоксин. Соли KCl, NH₄Cl, NaCl со слабогидратированными ионами практически не повышают, а в случае с рибофлавином понижают коэффициенты распределения. Установлено, что *n*-бутанол может быть успешно заменен на *n*-пропанол и изопропанол, которые образуют устойчивые экстракционные системы с насыщенным раствором (NH₄)₂SO₄, позволяющие достичь роста коэффициентов распределения рибофлавина до 11,3÷11,8.

Разработаны методики пробоподготовки пищевых продуктов с низким содержанием рибофлавина и обогащенных фолиевой кислотой плодоовощных, хлебобулочных и молочных продуктов с использованием экстракции.

1. Коренман Я.И., Смольский Г.М. // Журн. прикл. химии. 1991. Т. 64. № 9. С. 1916.

2. Справочник биохимика / Пер. с англ. Р. Досон, Д. Элиот. М., 1991.

3. Khasanov V.V., Dychko K.A., Ruzhova // Pharmaceutical Chemistry J. 1998. Vol. 32. № 2. P. 101.

4. Poe M. // The journal of biological chemistry. 1977. Vol. 252. № 11. P. 3724.

5. Ghasemi J., Ghobadi S., Abbasi B., Kubista M. // J. of the Korean Chemical Society. 2005. Vol. 49. № 3. P. 269.

6. Старобинец Г.Л., Рахманько Е.М., Халецкая Т.К. // ЖАХ. 1980. Т. 54. № 8. С. 2075.

7. Старобинец Г.Л., Рахманько Е.М., Воронова Г.И. // Изв. АН БССР. 1981. № 4. С. 33.

Поступила в редакцию 14.11.11.

Евгений Михайлович Рахманько – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии.

Елена Ильинична Полянских – соискатель кафедры аналитической химии. Научный руководитель – Е.М. Рахманько.

Ольга Васильевна Шуляковская – кандидат химических наук, заведующая лабораторией химии пищевых продуктов Республиканского научно-практического центра гигиены.