

Электрохимические методы определения аскорбиновой кислоты в биологически активных добавках

© 2022. А. И. Фокина, к. б. н., доцент,

Е. Г. Фоминых, к. т. н., доцент,

К. И. Южанин, магистрант,

Вятский государственный университет,

610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,

e-mail: annushka-fokina@mail.ru

Одним из последствий влияния неблагоприятных экологических факторов на человека является развитие в организме окислительного стресса. Существенную роль в борьбе с окислительными процессами играют антиоксиданты, в том числе аскорбиновая кислота (АК). Разработка методов количественного определения АК в фармацевтических препаратах и биологически активных добавках (БАД), содержащих несколько антиоксидантов и вспомогательные вещества, остаётся актуальной задачей.

Показана возможность применения кулонометрического с бипотенциометрической индикацией и прямого потенциометрического методов анализа для определения АК в БАД. Установлено, что при использовании иода в качестве окислителя оба метода позволяют получать хорошо повторяющиеся результаты (относительное среднеквадратичное отклонение не превышает 2,0%). Зависимость аналитического сигнала от массы навесок препаратов (в области 80–120% от стандартной массы 0,1 или 0,2 г в зависимости от методики) имеет линейный характер с R не менее 0,99, а результаты, полученные методом «введено-найдено», отвечают требованию правильности. Доказано, что рутин, глюкоза и вспомогательные вещества не мешают определению АК предлагаемыми методами.

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, глюкоза, рутин, кулонометрия, потенциометрия, определение.

Electrochemical methods for the determination of ascorbic acid in biologically active additives

© 2022. A. I. Fokina ORCID: 0000-0001-8265-8882

E. G. Fominykh ORCID: 0000-0001-9659-6521

K. I. Yuzhanin ORCID: 0000-0002-8359-1920

Vyatka State University,

36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,

e-mail: annushka-fokina@mail.ru

One of the negative consequences of the impact of adverse environmental factors on a humans is the development of oxidative stress in the body, which causes deviations in the state of human health. An important role in the fight against oxidative processes is played by antioxidants, including ascorbic acid (AA). Along with food, biologically active additives (BAA) can be an additional source of AA intake into the body.

The correct assessment of the AA content in pharmaceutical preparations helps to solve an important problem of food ecology – the balanced use of vitamin C. Therefore, the development of new and improvement of existing methods of analysis for determining the content of AA in various objects remains an urgent task.

The use of instrumental methods for fixing the end point of the titration increases the accuracy of the analysis. Simple and economical electrochemical methods such as potentiometry and coulometry can be used to implement the iodometric titration method. Despite all the advantages of coulometric and potentiometric methods of analysis and their widest distribution in various fields of science and technology, there are no data in the literature on the possibility of implementing the coulometric determination of AA with potentiometric indication and direct potentiometric titration, which are based on the reaction with iodine.

As a result of the study, it was found that in the determination of AA by both methods, well-repeated results were obtained (the relative standard deviation does not exceed 2.0%), the dependence of the analytical signal on the sample mass (in the range of 80–120% to standard weight 0,1 or 0,2 g depending on the method) is linear with R not less than 0.99, and the results obtained by the “introduced-found” method satisfy the requirement of correctness.

Keywords: ascorbic acid, glucose, rutin, coulometry, potentiometry, determination.

Известно, что заболевания человека могут быть вызваны многими экологическими факторами [1–3]. Неблагоприятная экологическая обстановка считается одной из главных причин развития в организме человека оксидативного стресса, который, в свою очередь, приводит к возникновению ряда серьёзных заболеваний [3–5]. Противостоять окислительным процессам способны антиоксиданты, в том числе аскорбиновая кислота (АК, витамин С) [6, 7].

Наряду с продуктами питания, источником поступления АК в организм могут быть соответствующие лекарственные формы и различные биологические активные добавки (БАД). Доказано положительное влияние АК на снижение интенсивности окислительных процессов [6, 7], однако чрезмерное её употребление может иметь и отрицательный эффект. Поэтому остаётся актуальной задача по разработке новых и совершенствованию существующих методов анализа для определения содержания АК в различных объектах: фармацевтических препаратах, растительном сырье, продуктах питания и т. д. [8–13].

В общем виде реакция, лежащая в основе кулонометрического и потенциометрического определений, заключается в обратимом окислении АК иодом до дегидроаскорбиновой кислоты. При реализации метода кулонометрии титрование происходит электрогенерированным на аноде при постоянной силе тока иодом. В методе потенциометрии титрование проводят стандартизованным раствором иода. Отсутствие необходимости стандартизовать раствор иода – положительная сторона кулонометрии. Количество иода, затраченное на реакцию с определяемой АК, рассчитывают по закону Фарадея. Кроме того, анализ достаточно экспрессный. Положительными сторонами потенциометрического определения являются экономичность и простота [14, 15].

Несмотря на все достоинства кулонометрического и потенциометрического методов анализа и их широчайшее распространение в различных областях науки и техники [15–18], в литературе отсутствуют данные о возможности реализации кулонометрического определения АК с потенциометрической индикацией и прямого потенциометрического титрования, в основе которых лежит реакция с иодом.

Поэтому целью работы было установить возможность применения кулонометрического метода с бипотенциометрической индикацией и прямого потенциометрического метода для определения АК в БАД, используя её реакцию с иодом.

Объекты и методы исследования

Использованы БАД «Аскорбиновая кислота + рутин», с заявленным производителем содержанием АК в таблетке 50 мг (ООО «ВТФ», Россия) и «Аскорбиновая кислота с глюкозой» с заявленным производителем содержанием АК в таблетке 100 мг (ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА», Россия).

Для определения влияния глюкозы и рутина на результат определения АК использованы модельные смеси АК с глюкозой (100 мг АК + 877 мг глюкозы) и АК с рутином (50 мг АК + 50 мг рутина).

Определение АК в препаратах методом кулонометрии. Кулонометрическое титрование проведено с бипотенциометрической индикацией на приборе марки «Эксперт-006» (ООО «ЭКОНИКС-ЭКСПЕРТ», Россия). Исследование препаратов вели по схеме: 0,1 г препарата (точная навеска) переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили дистиллированной водой объём раствора до метки. В кулонометрической ячейке использовали 0,1 М раствор иодида калия в 0,1 М соляной кислоте. Для анализа в кулонометрическую ячейку вносили 1 мл исследуемого раствора.

Определение АК в препаратах методом потенциометрии. Потенциометрическое титрование проведено с потенциометрической индикацией на приборе марки «И-160 МИ» (ООО «ЭКОНИКС-ЭКСПЕРТ», Россия) с использованием измерительного платинового электрода и хлорсеребряного электрода сравнения.

Для определения АК в препарате «Аскорбиновая кислота с глюкозой» исследование вели по схеме: 0,2 г препарата (точная навеска) переносили в ячейку для титрования. В качестве растворителя использовали 0,1 М соляную кислоту. Титровали 0,05 н. стандартизованным раствором иода.

Для определения АК в препарате «Аскорбиновая кислота + рутин» исследование вели по схеме: 0,1 г препарата (точная навеска) переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили дистиллированной водой объём раствора до метки. В электрохимической ячейке использовали 0,1 М соляную кислоту. Для анализа в ячейку вносили 4 мл исследуемого раствора. Титровали 0,05 н. стандартизованным раствором иода.

Для каждого метода определяли такие метрологические характеристики, как повторяемость ($n = 6$), линейность (пять уровней

концентрации АК создавали варьированием массы навески препарата: 80, 90, 100, 110 и 120%, $n = 3$) и правильность (добавляли известное количество стандартного образца к исследуемому раствору препарата, в качестве стандартного образца использовали АК; три уровня концентраций, $n = 3$).

Во всех расчётах значение величины доверительной вероятности принято $P \geq 0,95$. В качестве критерия приемлемости линейности ориентировались на значение $R \geq 0,99$, повторяемости – 2%.

Результаты и обсуждение

Метрологическая характеристика результатов определения АК в препарате «Аскорбиновая кислота с глюкозой». Установлено, что глюкоза не влияет на результат определения АК ни одним из исследуемых методов. Величина содержания АК (100 мг) в модельной смеси с глюкозой находится в доверительном интервале экспериментально найденных значений при исследовании смеси (100,1±2,5 мг – кулонометрия; 101,2±2,5 мг – потенциометрия), что подтверждает литературные данные [15] о возможности применения методов для определения АК в присутствии глюкозы.

По характеристике «линейность» обе методики показали схожие результаты: коэффициенты детерминации отличаются друг от друга в четвёртом знаке (рис. 1). В обоих случаях зависимости между аналитическими сигналами (продолжительность гене-

рации иода, затрачиваемого на окисление АК, – кулонометрия; объём раствора иода, пошедший на титрование, – потенциометрия) и массами навесок препарата имеют линейный характер ($R = 0,9974$ и $0,9972$ соответственно).

Оба метода дают повторяющиеся результаты, величина относительного среднеквадратичного отклонения (СКО) не превышает 2,0% (табл. 1). **Значение содержания АК**, полученное методом потенциометрии, несколько выше, чем значение, полученное методом кулонометрии. Между средними значениями, полученными разными методами, есть статистически достоверное различие (t -тест). Достоверное отличие между СКО отсутствует (F -тест).

Проверка правильности результатов (табл. 2) также даёт для потенциометрического определения результаты несколько выше, чем для кулонометрии. Одна из причин может заключаться в самой технике проведения анализа, в том числе, в особенностях дозирования иода в количествах, необходимых для более точной фиксации точки эквивалентности. Кулонометрический анализ позволяет более дискретно дозировать количество иода, не требует вмешательства в процесс дозирования какого-либо оборудования (бюреток, дозаторов и т. п.), вносящих погрешность в анализ. Вторая причина, приводящая к «завышению» результатов потенциометрического определения АК, по-видимому, связана с чувствительностью рабочего окислительно-восстановительного электрода (ОВЭ). Скачок

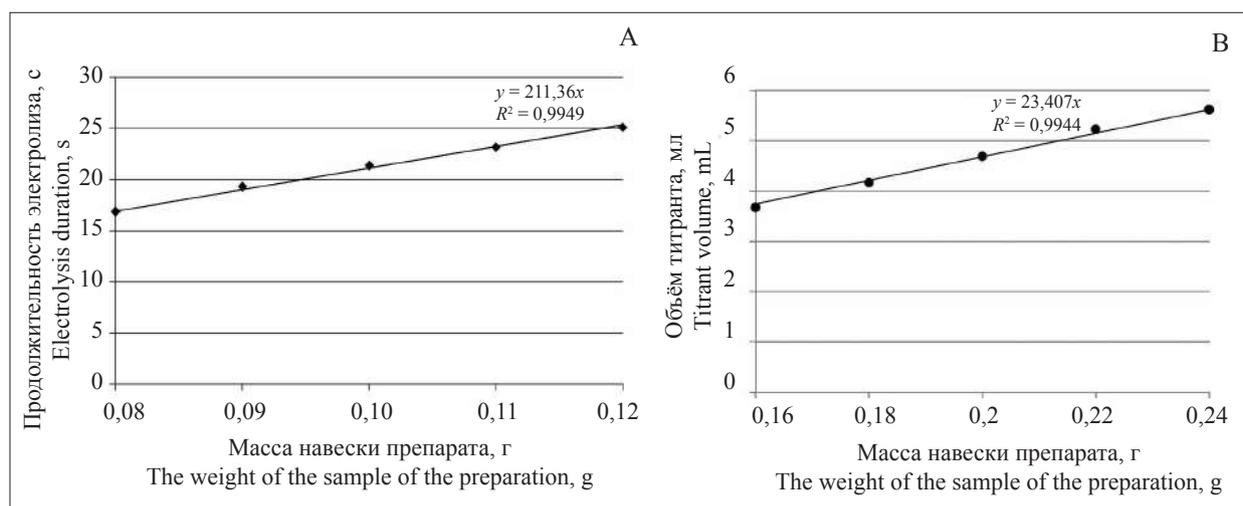


Рис. 1. Зависимость количественной характеристики титрования от массы навесок препарата: А – кулонометрия, В – потенциометрия
Fig. 1. Dependence of the quantitative characteristic of titration on the mass of the preparation samples: А – coulometry, В – potentiometry

Таблица 1 / Table 1

Метрологическая характеристика повторяемости результатов определения аскорбиновой кислоты в препарате «Аскорбиновая кислота с глюкозой» / Metrological characteristic of the repeatability of ascorbic acid in the preparation "Ascorbic acid with glucose"

Найдено, мг Found, mg	$X_{cp.}$, мг $X_{av.}$, mg	СКО Standard deviation (SD)	Относительное СКО, % Relative SD, %	$\Delta X = (CKO \cdot t) / \sqrt{n}$ $\Delta X = (SD \cdot t) / \sqrt{n}$
Кулонометрия / Coulometry				
98,5	98,8	1,29	1,31	1,61
98,7				
100,0				
100,0				
96,5				
99,1				
Потенциометрия / Potentiometry				
103,9	103,9	1,45	1,39	1,80
101,7				
103,5				
104,6				
103,5				
106,1				

Таблица 2 / Table 2

Данные для оценки правильности результатов определения аскорбиновой кислоты в препарате «Аскорбиновая кислота с глюкозой» / Data for assessing the correctness of the ascorbic acid determination results in the preparation "Ascorbic acid with glucose"

Введено аскорбиновой кислоты, мг Added ascorbic acid, mg	Найдено аскорбиновой кислоты, мг / Found ascorbic acid, mg	
	кулонометрия coulometry	потенциометрия potentiometry
80	80,7±0,8	83,0±5,2
100	99,8±1,0	105,0±5,4
120	119,8±3,6	123,5±7,7

потенциала в системе Pt | I₂, I⁻ (иодид-ион) на основании которого устанавливается точка эквивалентности, возникает только при появлении в анализируемом растворе избыточного иода. Расчёт по уравнению Нернста показывает, что изменение потенциала ОВЭ, например, на 20 мВ будет регистрироваться при соотношении концентраций $C_{I_2} / (C_{I^-})^2 = 4,7$, приводя к погрешности при фиксации конечной точки титрования.

Количество кислоты, указанное на упаковке, составляет 100 мг, что согласуется с результатом, полученным методом кулонометрии (98,8±1,4 мг). Методом потенциометрии получены более высокие результаты (103,9±1,5 мг).

Несмотря на более высокие значения, получаемые методом потенциометрического титрования, оба метода, с точки зрения норм допустимых отклонений, позволяют получить правильные результаты, так как значения добавок, принимаемые за истинные (опорные),

лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов (табл. 2).

Метрологическая характеристика результатов определения АК в препарате «Аскорбиновая кислота + рутин». Установлено, что рутин не влияет на результат определения АК ни одним из исследуемых методов. Значение содержания АК (50 мг) в модельной смеси с рутином находится в доверительном интервале экспериментально найденных значений при исследовании смеси (50,6±1,5 мг – кулонометрия; 52,5±2,6 мг – потенциометрия), что подтверждает литературные данные [14] о возможности применения методов для определения АК в присутствии рутина.

В результате исследования зависимости между аналитическим сигналом и массами навесок препарата (рис. 2) установлено, как в случае с кулонометрией, так и в случае с потенциометрией, наличие линейной зависимости ($R = 0,9932$ и $0,9956$ соответственно).

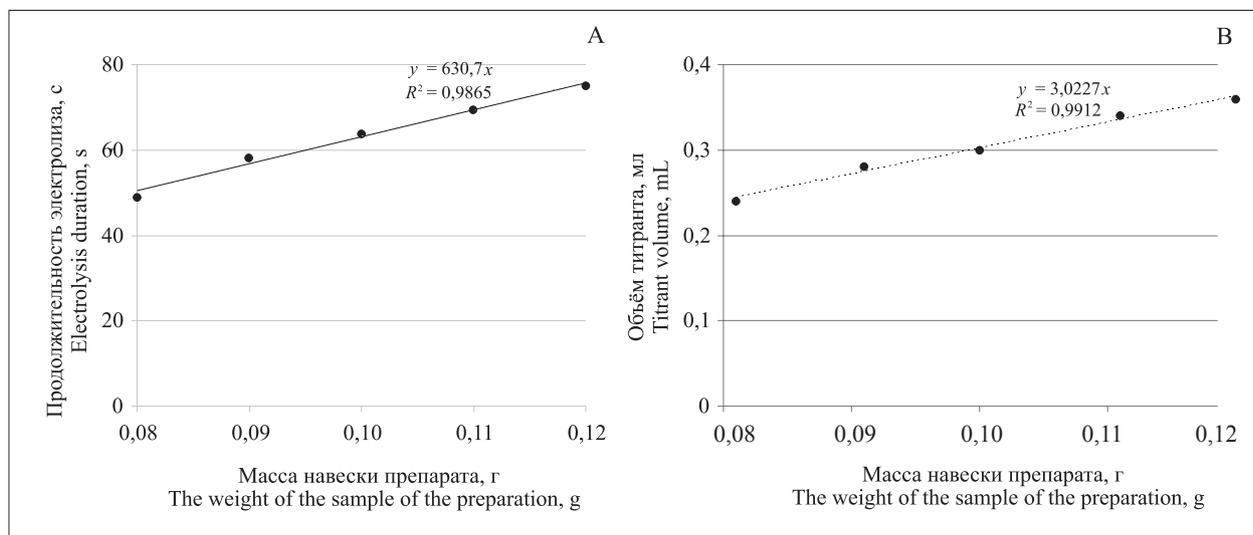


Рис. 2. Зависимость количественной характеристики титрования от массы навесок препарата: А – кулонометрия, В – потенциометрия
Fig. 2. Dependence of the quantitative characteristic of titration on the mass of the preparation samples: А – coulometry, В – potentiometry

Как и в случае с препаратом «Аскорбиновая кислота с глюкозой» присутствует тенденция к увеличению результатов, получаемых методом потенциометрии при определении АК в препарате «Аскорбиновая кислота + рутин». Однако достоверного отличия между средними значениями, полученными разными методами не обнаружено (*t*-тест). Это указывает на наличие влияния не только факторов, связанных с самой методикой, но и с особенностями препарата. Результаты, полученные методом

кулонометрии, близки к среднему значению содержания АК, указанному на упаковке производителем (50 мг). **Результаты потенциометрического титрования** несколько выше (табл. 3).

При проверке правильности получаемых результатов показано, что значения добавок, принимаемых за истинные (опорные), лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов. Следовательно, получаемые результаты можно считать правильными (табл. 4).

Таблица 3 / Table 3

Метрологическая характеристика повторяемости результатов определения аскорбиновой кислоты в препарате «Аскорбиновая кислота+рутин» / Metrological characteristic of the repeatability of ascorbic acid in the preparation “Ascorbic acid + rutin”

Найдено, мг Found, mg	$X_{cp.}, мг$ $X_{av.}, mg$	СКО Standard deviation (SD)	Относительное СКО, % Relative SD, %	$\Delta X = (CKO \cdot t) / \sqrt{n}$ $\Delta X = (SD \cdot t) / \sqrt{n}$
Кулонометрия / Coulometry				
50,8	51,1	1,04	2,04	1,29
49,5				
50,3				
51,9				
51,8				
52,1				
Потенциометрия / Potentiometry				
53,1	52,9	0,92	1,73	1,14
52,2				
52,0				
54,5				
52,4				
53,1				

Таблица 4 / Table 4

Данные для оценки правильности результатов определения аскорбиновой кислоты в препарате «Аскорбиновая кислота + рутин» / Data for assessing the correctness of the ascorbic acid determination results in the preparation "Ascorbic acid + rutin"

Введено аскорбиновой кислоты, мг Added ascorbic acid, mg	Найдено аскорбиновой кислоты, мг / Found ascorbic acid, mg	
	кулонометрия coulometry	потенциометрия potentiometry
40,0	41,0±1,5	41,4±1,6
50,0	51,7±1,7	52,2±2,7
60,0	61,8±1,9	—

Примечание / Note: «—» — данные отсутствуют / no data.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что при определении АК обоими методами получаются хорошо повторяющиеся результаты (относительное СКО не превышает 2,0%), зависимость аналитического сигнала от массы навесок препаратов (в области 80–120%) имеет линейный характер с R не менее 0,99, а результаты, получаемые методом «введено-найденно» отвечают требованию правильности. Всё это указывает на то, что имеет смысл исследовать особенности применения данных методов для определения АК в фармацевтических препаратах в сторону улучшения метрологических характеристик и внедрения их в аналитический контроль качества.

Следует отметить, что необходим поиск оптимального проведения потенциометрического анализа с целью минимизации погрешностей, связанных с точностью дозирования титранта и индикацией точки конца титрования.

Полученные данные и предложенные методические подходы могут быть полезны в экологических исследованиях антиоксидантной активности различных растительных объектов и трактовке результатов, так как титрование растворами галогенов в настоящее время является одним из ведущих принципов анализа.

References

1. Abdurakhmanov G.M., Gasangadzhieva A.G., Abdurakhmanova E.G., Magomedova A.G. The state of environmental components and the incidence of malignant neoplasms in the Laksky district of the Republic of Dagestan // Problemy regionalnoy ekologii. 2006. No. 6. P. 30–33 (in Russian).
2. Cherevatenko A.A. Environmental risk factors for human health // Zhurnal fundamentalnoy meditsiny i biologii. 2018. No. 3. P. 39–45 (in Russian).
3. Tseylikman V.E., Lukin A.A. Effects of oxidative stress on human health // Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal. 2022. No. 3–1 (117). P. 206–211 (in Russian). doi: 10.23670/IRJ.2022.117.3.037

4. Skugoreva S.G., Ashikhmina T.Ya., Fokina A.I., Lyalina E.I. Chemical groups of toxic effect of heavy metals (review) // Theoretical and Applied Ecology. 2016. No. 1. P. 4–13 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2016-1-014-019

5. Golovko T.K., Silina E.V., Lashmanova E.A., Kozlovskaya A.V. Reactive oxygen species and antioxidants in living systems: an integrated overview // Theoretical and Applied Ecology. 2022. No. 1. P. 17–26 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2022-1-017-026

6. Ramanathan K., Balakumar B.S., Panneerselvam C. Effects of ascorbic acid and a-tocopherol on arsenic-induced oxidative stress // Human & Experimental Toxicology. 2002. V. 21. No. 12. P. 675–680. doi: 10.1191/0960327102ht307oa

7. Patra R.C., Swarup D., Dwivedi S.K. Antioxidant effects of α tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats // Toxicology. 2001. V. 162. No. 2. P. 81–88. doi: 10.1016/S0300-483X(01)00345-6

8. Burykh G.V., Gusel'nikova T.V., Durnev D.A., Kosyashnikova Yu.A. Determination of the content of ascorbic acid in the drug "Asvitol" by spectrophotometric and chromatographic methods // Izvestiya Yugo-zapadnogo universiteta: Seriya: tekhnika i tekhnologii. 2022. No. 1. P. 219–244 (in Russian). doi: 10.21869/2223-1528-2022-12-1-219-234

9. Kholod V.M., Pipkina T.V. On the possibility of using various methods for the determination of ascorbic acid in pharmacopoeial analysis // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya "Vitebskaya ordena "Znak Pocheta" gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny". 2021. V. 57. P. 117–122 (in Russian). doi: 10.52368/2078-0109-2021-57-3-117-122

10. Zhdanov D.A., Kurkin V.A., Braslavskiy V.B., Agapov A.I. Actual aspects of quality control and standardization of rose hips // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2021. No. 3. P. 167–175 (in Russian). doi: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-167-175

11. Atta N.F., Galal A., Ahmed Y.M., El-Ads E.H. Design strategy and preparation of a conductive layered electrochemical sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, dobutamine, acetaminophen and amlodipine // Sensors and Actuators B: Chemical. 2019. V. 297. Article No. 126648. doi: 10.1016/j.snb.2019.126648

12. Habib A., Mabrouk M.M. Fekry M., Mansour F.R. Glycerol as a new mobile phase modifier for green liquid chromatographic determination of ascorbic acid and glutathione in pharmaceutical tablets // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022. V. 219. Article No. 114870. doi: 10.1016/j.jpba.2022.114870

13. Li Yu., Pan F., Yin Sh., Tong Ch., Zhu R., Li G. Nafion assisted preparation of prussian blue nanoparticles and its application in electrochemical analysis of L-ascorbic acid // *Microchemical Journal*. 2022. V. 177. Article No. 107278. doi: 10.1016/j.microc.2022.107278

14. Ziyatdinova G.K., Nizamova A.M., Budnikov G.K. Galvanostatic coulometry in the analysis of natural polyphenols and its application in pharmacy // *Zhurnal analiticheskoy khimii*. 2010. No. 11. P. 1202–1206 (in Russian).

15. Lira O.A., Abdullina S.G. Coulometric determination of ascorbic acid // *Obrazovatelnyy vestnik "Soznanie"*. 2010. V. 12. No 9. P. 431–432 (in Russian).

16. Mashentseva A.A., Kazbekova A.T., Seytembetov T.S. Application of electrochemical methods to determine the antioxidant activity of polyphenolic compounds // *Khabarshysy vestnik*. 2010. V. 4. P. 10–18 (in Russian).

17. Majeed S., Naqvi S.T.R., Haq M.N., Ashiq M.N. Electroanalytical techniques in biosciences: conductometry, coulometry, voltammetry, and electrochemical sensors // *Analytical Techniques in Biosciences*. 2022. P. 157–178. doi: 10.1016/B978-0-12-822654-4.00004-X

18. Budnikov G.K., Shirokova V.I. Development of electroanalysis in the USSR and Russia: coulometric methods // *Zhurnal analiticheskoy khimii*. 2015. No. 1. P. 92–98 (in Russian). doi: 10.7868/S0044450215010053