

<https://doi.org/10.21869/2223-1528-2022-12-3-184-200>



Оптимизация условий определения фолиевой кислоты спектрофотометрическим, флуориметрическим и хроматографическим методами анализа

Е. В. Мелихова¹ ✉, Г. А. Егоров¹, Е. И. Лазуткина¹, А. В. Елфимова¹

¹ Липецкий государственный технический университет
ул. Московская 30, г. Липецк 398055, Российская Федерация

✉ e-mail: mev80@yandex.ru

Резюме

Цель исследования – оценка возможности применения лекарственного препарата фолиевой кислоты в качестве стандартного образца и выбор условий определения фолиевой кислоты спектрофотометрическим, флуориметрическим и хроматографическим методами анализа с наилучшими метрологическими показателями.

Методы. Для спектрофотометрических измерений использовали двухлучевой сканирующий спектрофотометр UV-1800 Shimadzu (Япония), для оценки флуоресценции – анализатор жидкости «Флюорат-02-Панорама» (Россия), для хроматографических исследований – жидкостной хроматограф LC-20AD фирмы Shimadzu (Япония), оснащенный спектрофотометрическим детектором SPD-M20A и колонкой Nucleosil C18 (октадецил), размером 25 x 4,6 мм, фирмы Supelcosil. Методика спектрофотометрического определения фолиевой кислоты основана на реакции получения азокрасителя с устойчивой фиолетовой окраской, интенсивность которой пропорциональна содержанию аналита. Методика флуориметрического определения фолиевой кислоты базируется на окислении аналита перманганатом калия, в результате чего образуются продукты реакции, обладающие флуоресценцией. В основу хроматографического анализа положена прямопропорциональная зависимость площади пика и концентрации фолиевой кислоты.

Результаты. В работе изучено влияние природы и pH четырех буферных растворов на степень извлечения фолиевой кислоты из лекарственных форм. Наиболее полное извлечение аналита ($R = 96,83\%$) зафиксировано в случае применения фосфатного буферного раствора с pH 6,8. Предложен флуориметрический способ определения фолиевой кислоты с большей в сравнении с гостированными методиками чувствительностью, предел обнаружения составил 0,02 мкг/мл. За счет разрыва концентрационного диапазона аналита чувствительность колориметрического метода увеличена и предел обнаружения снижен до 0,13 мкг/мл. Разработана хроматографическая методика определения фолиевой кислоты с линейным диапазоном 0,1–10 мкг/мл и пределом обнаружения 0,1 мкг/мл.

Заключение. Предложенные методики определения фолиевой кислоты апробированы при анализе образцов коровьего молока и белой фасоли. Использование теста Фишера и модифицированного теста Стьюдента показало отсутствие систематической ошибки.

Ключевые слова: спектрофотометрия; флуориметрия; высокочувствительная жидкостная хроматография; фолиевая кислота; пищевые продукты.

Конфликт интересов: Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Оптимизация условий определения фолиевой кислоты спектрофотометрическим, флуориметрическим и хроматографическим методами анализа / Е. В. Мелихова, Г. А. Егоров, Е. И. Лазуткина, А. В. Елфимова // Известия Юго-Западного государственного университета. Серия: Техника и технологии. 2022. Т. 12, № 3. С. 184–200. <https://doi.org/10.21869/2223-1528-2022-12-3-184-200>

Поступила в редакцию 30.07.2022

Подписана в печать 29.08.2022

Опубликована 28.09.2022

Optimization of Conditions for the Determination of Folic Acid by Spectrophotometric, Fluorimetric and Chromatographic Methods of Analysis

Elena V. Melikhova¹ ✉, Gennady A. Egorov¹, Elizaveta I. Lazutkina¹,
Alexandra V. Elfimova¹

¹ Lipetsk State Technical University
Moskovskaya Str., Lipetsk 398055, Russian Federation

✉ e-mail: mev80@yandex.ru

Abstract

Purpose. The aim of the work was to assess the possibility to use a folic acid drug as a standard sample and to choose the conditions of determination of folic acid by spectrophotometric, fluorimetric and chromatographic methods of analysis with the best metrological parameters.

Methods. For spectrophotometric measurements we used a two-beam scanning spectrophotometer UV-1800 Shimadzu (Japan), for evaluation of fluorescence - liquid analyzer "Fluorat-02-Panorama" (Russia), For chromatographic studies - liquid chromatograph LC-20AD from Shimadzu (Japan), equipped with a spectrophotometric detector SPD-M20A and a column Nucleosil C18 (octadecyl), size 25 x 4,6 mm, firm Supelcosil. The method of spectrophotometric determination of folic acid is based on the reaction of obtaining an azo dye with a steady violet color, the intensity of which is proportional to the content of the analyte. The fluorimetric determination of folic acid is based on the oxidation of the analyte with potassium permanganate, which produces reaction products with fluorescence. Chromatographic analysis is based on a directly proportional relationship between peak area and folic acid concentration.

Results. In this work we studied the influence of the nature and pH of four buffer solutions on the degree of extraction of folic acid from dosage forms. The most complete extraction of the analyte ($R = 96.83\%$) was detected in case of using phosphate buffer solution with pH 6.8. A fluorimetric method of determination of folic acid with higher sensitivity as compared to the state methods was proposed, the detection limit was 0.02 µg/ml. Due to a break in the concentration range of the analyte, the sensitivity of the colorimetric method was increased, the detection limit was reduced to 0.13 µg/ml. A chromatographic method of folic acid determination with a linear range of 0.1 - 10 µg/ml, and a detection limit of 0.1 µg/ml were developed.

Conclusion. The proposed methods for determining folic acid have been validated in the analysis of samples of cow's milk and white beans. The use of Fisher's test and a modified Student's test showed the absence of systematic error.

Keywords: spectrophotometry; fluorimetry; high-performance liquid chromatography; folic acid; food products.

Conflict of interest: The authors declares the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Melikhova E. V., Egorov G. A., Lazutkina E. I., Elfimova A. V. Optimization of Conditions for Determination of Folic Acid by Spectrophotometric, Fluorimetric and Chromatographic Methods of Analysis. *Izvestiya Yugo-Zapadnogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Tekhnika i tekhnologii = Proceedings of the Southwest State University. Series: Engineering and Technologies*. 2022; 12(3): 184–200. (In Russ.) <https://doi.org/10.21869/2223-1528-2022-123-184-200>

Received 30.07.2022

Accepted 29.08.2022

Published 28.09.2022

Введение

Фолиевая кислота (витамин В₉) – водорастворимый витамин, содержащийся в овощах, злаках, продуктах животного происхождения [1], который незаменим для нормального функционирования организма, способствует синтезу белков и аминокислот и находит все более широкое применение при производстве новых лекарственных средств и пищевых добавок [2; 3]. В настоящее время гостированных методик для определения фолиевой кислоты не существует. Проводимые в лабораториях исследования опираются, как правило, на нормативные документы для внутреннего пользования. Наиболее часто для определения фолиевой кислоты (ФК) применяют спектрофотометрические [4–6], флуориметрические [7; 8] и хроматографические [9–17] методы анализа, метрология которых во многом зависит от эффективности этапов пробоподготовки и выбора условий проведения анализа. Таким образом, целью представленной работы являлся выбор условий определения фолиевой кислоты спектрофотометрическим, флуориметрическим и хроматографическим методами анализа с наилучшими метрологическими показателями.

Материалы и методы

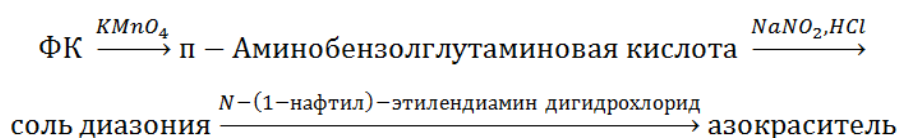
В качестве анализа применяли аналитический стандарт фолиевой кислоты (Sigma-Aldrich, США) и лекарственный препарат фолиевой кислоты (В₉) – N-{п-[(2-амино-4-гидроксиокси-6-птеридинил)метил]-амино}бензоил-L-глутаминовая кислота с содержанием вещества 1 мг (ОАО «Валента Фармацевтика», Россия). При приготовлении стандартного раствора анализа с концентрацией 20 мкг/мл навеску стандарта или таблетку лекарственного препарата заливали 50 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,1, 6,8, 7,0 и 7,1 [18, с. 359]. Раствор лекарственного препарата перемешивали в течение 30 минут при температуре 37–40°C, охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр «синяя лента». Стандартные растворы витаминов группы В (В₁, В₃, В₆, В₁₂) с концентрацией 20 мкг/мл готовили аналогичным образом. Все растворы хранили в холодильнике без доступа света.

Для спектрофотометрических измерений использовали двухлучевой сканирующий спектрофотометр UV-1800 Shimadzu (Япония), для оценки флуоресценции – анализатор жидкости «Флюо-

рат-02-Панорама» (Россия), для хроматографических исследований – жидкостной хроматограф LC-20AD фирмы Shimadzu (Япония), оснащенный спектрофотометрическим детектором SPD-M20A и колонкой Nucleosil C18 (октадецил), размером 25×4,6 мм, фирмы Supelcosil.

Модифицированная методика спектрофотометрического определения фолиевой кислоты основана на реакциях, схемы которых приведены на рисунке 1, получаемый при этом азокраситель имеет устойчивую фиолетовую окраску, интенсивность которой пропорциональна содержанию аналита. К аликвоте стандартного раствора (5 мл) добавляли 1 мл 0,4%-ного раствора перманганата калия, перемешивали и через 2-3 минуты приливали по 1 мл 2%-ного раствора нитрита натрия и раствора соляной кислоты (разведение 2:3). Опять

перемешивали и по истечении 2-минутного перерыва последовательно прибавляли 1 мл 5%-ного раствора сульфаминовой кислоты и 1 мл 0,1%-ного раствора *N*-(1-нафтил)-этилендиамина дигидрохлорида. Растворы выдерживали 10 минут и измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре UV-1800 Shimadzu (Япония) в кювете, толщиной 2 см, относительно контрольного раствора, содержащего все компоненты пробы, кроме аналита. Градуировочный график определения фолиевой кислоты строили в диапазоне 2,5–20 мкг/мл, для чего серию стандартных растворов готовили последовательным разведением исходного раствора с концентрацией 20 мкг/мл. Схема реакций окисления фолиевой кислоты и образования азокрасителя следующая:



Методика флуориметрического определения фолиевой кислоты базируется на окислении аналита перманганатом калия, в результате чего образуется 6-птеринкарбоновая кислота, дающая характерно голубую флуоресценцию. Аликвоту стандартного раствора (10 мл) подкисляли 2%-ным раствором серной кислоты до pH = 3 и добавляли 4%-ный раствор перманганата калия до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 10 минут. Для удаления избытка

перманганата калия к полученному раствору по каплям добавляли 3%-ный раствор перекиси водорода и доводили pH до 4,0–4,5 15%-ным раствором гидроксида натрия. Общий объем пробы доводили до 20 мл дистиллированной водой, фильтровали и измеряли интенсивность флуоресценции на анализаторе «ФЛЮОРАТ-02-ПАНОРАМА». Градуировочный график определения фолиевой кислоты строили в диапазоне 0,03125 – 0,5 мкг/мл.

Пробоподготовка образцов пищевых продуктов [19; 20]. Образцы молока тщательно перемешивали и сокращали до 35 мл. Пробы заливали 45 мл фосфатного буферного раствора и добавляли несколько капель 15%-ного раствора серной кислоты до $\text{pH} = 3,5\text{--}4,0$. После перемешивания пробы нагревали на водяной бане в слабоосвещенной комнате при температуре $70\text{--}80^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. После кислотного гидролиза растворы охлаждали до 30°C и 15% раствором гидроксида натрия доводили их pH до $4,5\text{--}5,0$. Осаждение белков осуществляли с помощью раствора уксусной кислоты, отделяли центрифугированием с центробежным ускорением 5000 g. Полученные супернатанты фильтровали, подкисляли 15%-ным раствором серной кислоты до $\text{pH} = 3$, вносили 100 мг модифицированного активированного угля, кипятили 5 минут и отфильтровывали через бумажный фильтр, фильтрат отбрасывали. Для промывки фильтра и извлечения фолиевой кислоты из угля через тот же фильтр пропускали горячий раствор, содержащий 3%-ный раствор аммиака в 70%-ном спирте. Объединенный фильтрат объемом 70 мл упаривали досуха на ротационном испарителе при 70°C . Сухой остаток растворяли в 10 мл фосфатного буферного раствора ($\text{pH} = 6,8$). Срок хранения подготовленных проб в холодильнике при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ не более 12 ч.

Гомогенизированные образцы фасоли тщательно перемешивали и сокращали до 20 г, пробы заливали 70 мл фосфатного буферного раствора. Далее про-

боподготовка не отличалась от вышеописанной методики пробоподготовки образцов молока.

Для уменьшения сорбционной емкости активированного угля (ЗАО «Обновление», Россия) его заливали десятикратным количеством 10%-ного водного раствора анилина, кипятили на электрической плитке под тягой при помешивании 1 ч, промывали 5–6 раз дистиллированной водой, высушивали при $30\text{--}40^\circ\text{C}$. Модифицированный активированный уголь хранили в склянке с притертой пробкой.

Результаты и их обсуждение

Спектрофотометрически установлено совпадение максимумов светопоглощения (256, 283, 365 нм) растворов фолиевой кислоты (рис. 1, а) производства Sigma-Aldrich и лекарственного препарата. Максимумы и минимумы вспомогательных компонентов препарата (рис. 1, б) не совпадают со спектральными характеристиками фолиевой кислоты, тем самым не вносят вклад в полезный сигнал и не искажают экспериментальные данные.

Для извлечения фолиевой кислоты, как правило, применяют нейтральные или слабощелочные буферные системы, поэтому в работе оценено влияние фосфатных буферных растворов с pH 6,1, 6,8, 7,0, 7,4 на степень извлечения (R) фолиевой кислоты. Оценку влияния pH на R проводили спектрофотометрически без предварительной дериватизации при 280 нм. Полученные результаты (табл. 1) показали схожую метрологию, однако

учет наибольшей линейности в области низких концентраций (до 20 мкг/мл), а также максимальное значение степени извлечения $96 \pm 2\%$ позволили сделать выбор в пользу фосфатного буферного

раствора с рН 6,8. Таким образом, проведенные исследования подтвердили возможность применения образца лекарственной формы ФК в качестве стандарта.

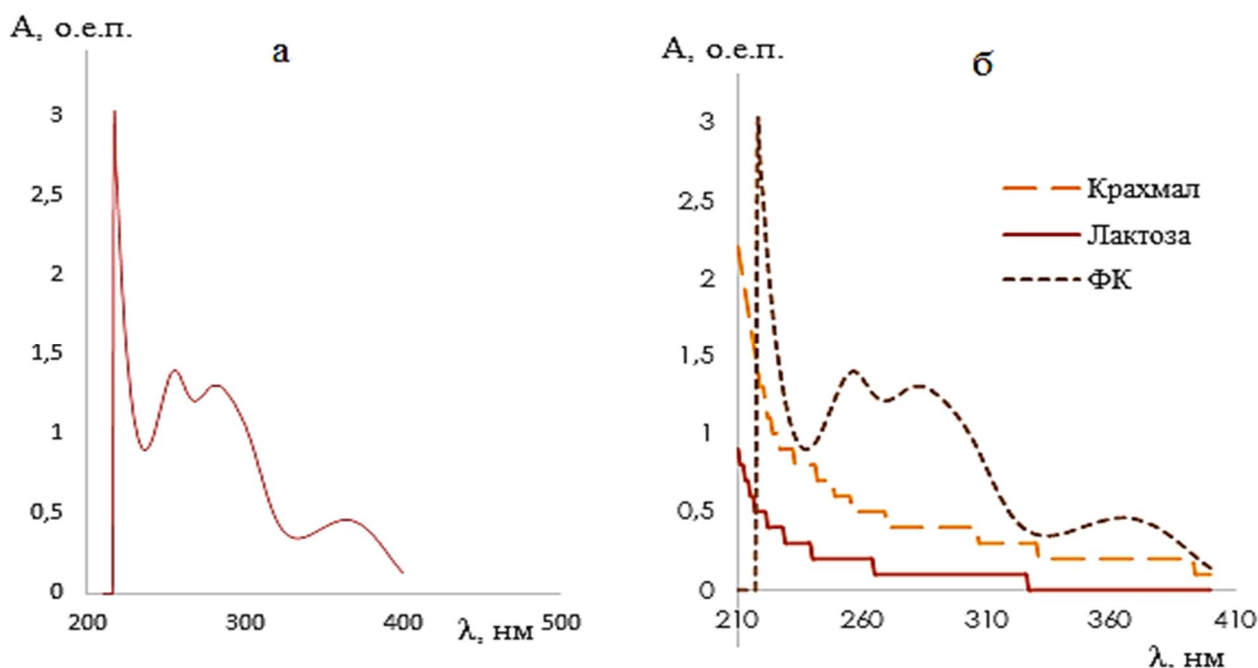


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от длины волны 0,001% растворов фолиевой кислоты (а) и вспомогательных компонентов (б)

Fig. 1. Dependence of absorbance on wavelength of 0.001% solutions of folic acid (a) and auxiliary components (б)

Таблица 1. Метрологические характеристики (n = 3, P = 0,95)

Table 1. Metrological characteristics (n = 3, P = 0.95)

рН фосфатного буферного раствора	Уравнение градуировочного графика	R ²	s _r	R, %
6,1	$y = 0,076x + 0,03$	0,991	0,03	95±3
6,8	$y = 0,079x + 0,06$	0,996	0,02	96±2
7,0	$y = 0,073x - 0,04$	0,990	0,03	95±3
7,4	$y = 0,072x + 0,06$	0,981	0,04	91±4

Поскольку совместное присутствие витаминов может усиливать, подавлять или смещать спектр, экспериментально получены индивидуальные спектры витаминов и спектры двухкомпонентных и

четырёхкомпонентных смесей аналита с витаминами В₁, В₃, В₆, В₁₂ по модифицированной и немодифицированной методикам (рис. 2).

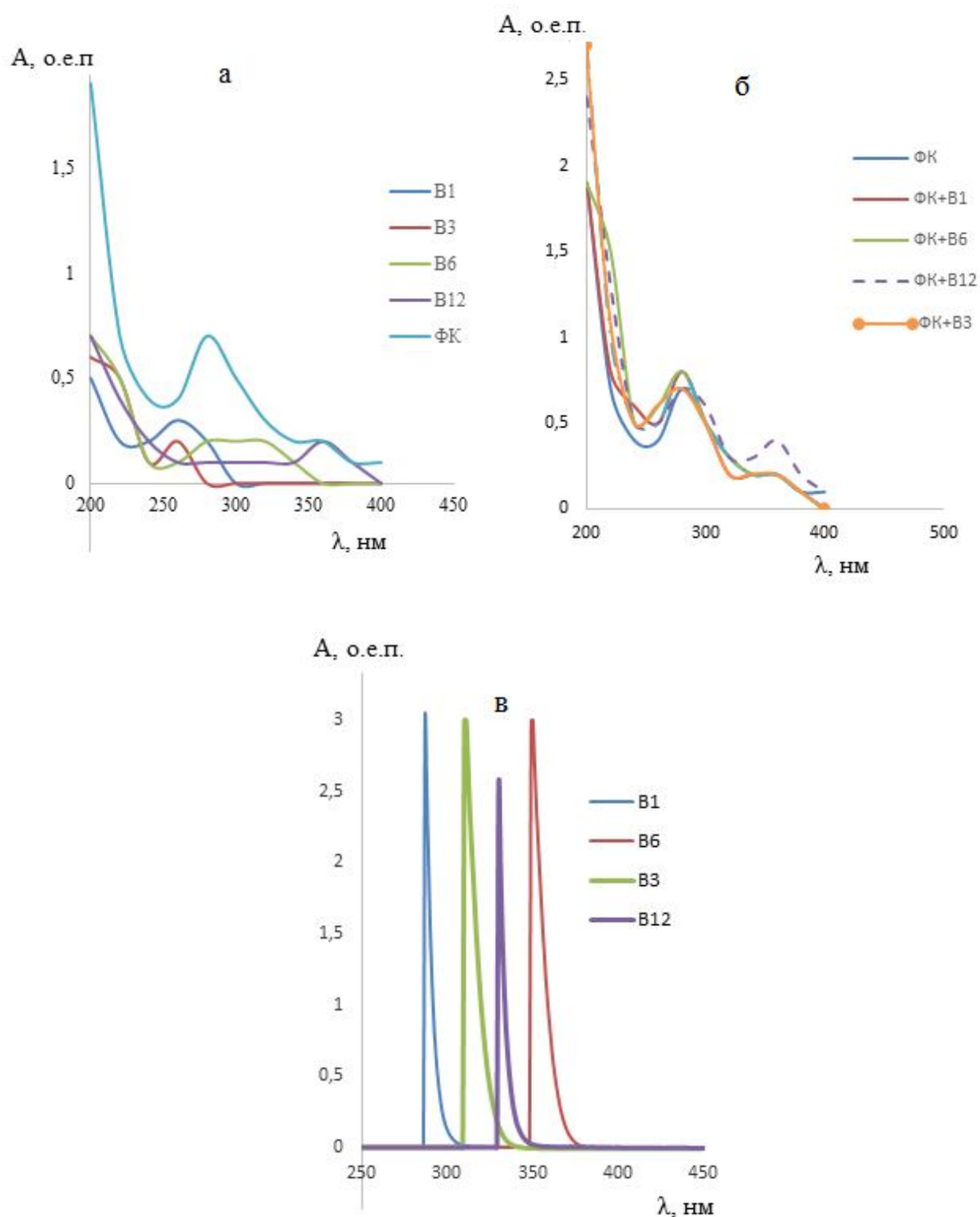


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от длины волны индивидуальных растворов витаминов (а) и их смесей в фосфатном буферном растворе (рН = 6,8) с концентрациями 10 мкг/мл (б) и 30 мкг/мл (в)

Fig. 2. Dependence of optical density on the wavelength of individual solutions of vitamins (a) and their mixtures in phosphate buffer solution (pH = 6.8) with concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$ (б) and 30 $\mu\text{g/mL}$ (в)

Анализ спектров показал, что вклад в максимум светопоглощения ФК может ожидать в присутствии витаминов В₁ и В₆, что и подтверждается на рисунке 2, б. В случае присутствия этих витаминов в пробе оптическая плотность увеличивается в среднем на 0,1 о.е.п. Также установлено, что с увеличением концентрации витаминов группы В до 30 мкг/мл совместное определение с ФК невозможно (см. рис. 2, в).

Таким образом, применение немодифицированной спектрофотометрической методики целесообразно для качественного и количественного определения фолиевой кислоты в присутствии витаминов В₃ и В₁₂ с концентрацией, не превышающей 25 мкг/мл, а также в отсутствие витаминов В₁ и В₆. В случае модифицированной методики максимум светопоглощения раствора окрашенного производного ФК ($c = 20$ мкг/мл) зафиксирован при 550 нм. Поскольку интенсивность окраски раствора производного ФК в области высоких и низких концентраций различна, то для уменьшения ошибки и уве-

личения правильности получаемых результатов градуировочный график разбили на две области: высоких ($l = 20$ мм) и низких концентраций ($l = 50$ мм) раствора ФК. Оценка присутствия водорастворимых витаминов В₁, В₃, В₆ и В₁₂ с концентрациями 10 мкг/мл на спектральные характеристики аналита показала, что максимум светопоглощения ФК в этом случае свободен от наложения спектральных линий витаминов группы В, при этом увеличение концентрации витаминов группы В не вносит изменений в рабочий диапазон аналита. Это позволяет рекомендовать спектрофотометрическую методику для качественного и количественного определения фолиевой кислоты в присутствии витаминов группы В (В₁, В₃, В₆, В₁₂) различной концентрации. Метрологические характеристики модифицированной спектрофотометрической методики представлены в таблице 2. Разрыв концентрационного диапазона позволил проводить детектирование ФК в области малых концентраций с большей чувствительностью и воспроизводимостью.

Таблица 2. Метрологические характеристики модифицированной спектрофотометрической методики определения фолиевой кислоты ($n = 3$, $P = 0,95$)

Table 2. Metrological characteristics of the modified spectrophotometric method for determining folic acid ($n = 3$, $P = 0.95$)

Уравнение градуировочного графика	Линейный диапазон, мкг/мл	C_{min} , мкг/мл	R^2
$y = 0,23x + 0,01$	0,0005 – 0,625	0,13	0,99
$y = 0,07x + 0,04$	5 – 20	0,44	0,98

Флуориметрические исследования продукта окисления фолиевой кислоты проводили при экспериментально установленных оптимальных условиях: длина волны возбуждения 230 нм; коррекция канала флуоресценции отключена; чувствительность фотоэлектроум-

ножителя средняя; число вспышек 25, длина волны люминесценции фолиевой кислоты 335 нм. Для исключения влияния концентрационного тушения получена зависимость интенсивности спектра флуоресценции фолиевой кислоты от ее концентрации в растворе (рис. 3).

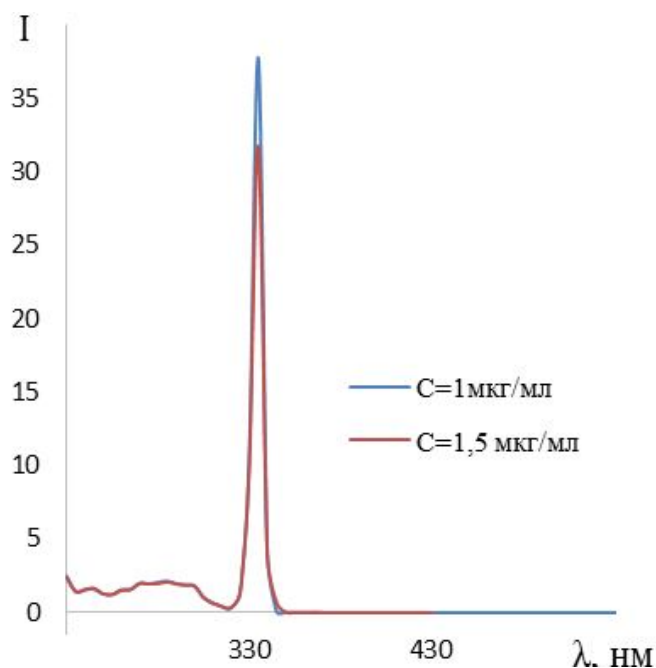


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации ФК

Fig. 3. Dependence of fluorescence intensity on folic acid concentration

При увеличении концентрации фолиевой кислоты свыше 1 мкг/мл квантовый выход люминесценции исследуемого образца уменьшается. С учетом концентрационного предела построен

градуировочный график и рассчитаны метрологические характеристики флуориметрической методики определения ФК (табл. 3)

Таблица 3. Метрологические характеристики флуориметрического метода определения ФК
($n = 3$, $P = 0,95$)

Table 3. Metrological characteristics of the fluorimetric method for determining folic acid ($n=3$, $P=0.95$)

Уравнение градуировочного графика	Линейный диапазон, нг/мл	$C_{\min}$, нг/мл	R^2
$y = 36,3x + 1,4$	62,5 – 1000	2,1	0,996

Анализ результатов оценки влияния присутствия и концентрации витаминов группы В на интенсивность флуоресценции аналита показал, что максимум свободен от наложения спектральных линий. Таким образом, флуориметрическая методика подходит для качественного и количественного определения фолиевой кислоты в присутствии витаминов В₁, В₃, В₆, В₁₂ различной концентрации.

Для выбора условий хроматографического детектирования фолиевой кислоты в изократическом режиме на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20AD со спектрофотометрическим де-

тектором SPD-M20A и колонкой Supercosil LC-18 варьировали следующие параметры: состав подвижной фазы ацетонитрил:фосфатный буферный раствор (рН = 6,8) в соотношении 5:95 и 10:90, температура колонки в диапазоне 30–50°C, а также скорость потока носителя в диапазоне 0,8–1,4 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волны 280 нм. Наилучшие метрологические (табл. 4) и хроматографические характеристики анализа установлены при элюенте ацетонитрил:фосфатный буферный раствор (рН = 6,8) в соотношении 5:95, скорости потока 1,0 мл/мин и температуре колонки 30°C.

Таблица 4. Метрологические характеристики хроматографического определения ФК (n = 3, P = 0,95)

Table 4. Metrological characteristics of chromatographic for determining folic acid (n = 3, P = 0.95)

Уравнение градуировочного графика	Линейный диапазон, мкг/мл	R ²	C _{min} , мкг/мл	S _r
$y = 53,3x - 1,08$	0,1-10,0	0,99	0,05	0,02

Проверку правильности предложенных методик определения фолиевой

кислоты проводили методом «введено-найденно» (табл. 5)

Таблица 5. Проверка правильности методик методом «введено-найденно» (n = 3, P = 0,95)

Table 5. Verification of correctness of procedures by "introduced-found" method (n = 3, P = 0.95)

Метод анализа	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	S _r
Колориметрия	1,000	0,975±0,070	0,03
Флуориметрия	1,000	0,980±0,050	0,02
ВЭЖХ	1,000	0,970±0,050	0,02

Апробацию предложенных методик проводили при анализе образцов коровьего молока и белой фасоли производства (г. Липецк). Пробоподготовку образцов и дальнейшее определение спектрофотометрическим, флуориметрическим (с вычетом сигнала холостого раствора) и хроматографическим методами анализа осуществляли согласно вышеописан-

ным методикам. Расчет содержания фолиевой кислоты в образцах реальных объектов с учетом степени извлечения осуществляли по градуировочным функциям, результаты приведены в таблице 6. Рассчитанное содержание фолиевой кислоты в реальных образцах оказалось немного ниже среднестатистических норм.

Таблица 6. Результаты определения аналита в реальных объектах ($n = 3$, $P = 0,95$)

Table 6. Results of analyte determination in real objects ($n = 3$, $P = 0.95$)

Образец	Метод анализа	Среднее содержание ФК, мкг/100 г	Рассчитанное содержание ФК, мкг/100 г	s_r
Молоко	Спектрофотометрия	5	$4,40 \pm 0,22$	0,02
	Флуориметрия		$4,50 \pm 0,22$	0,02
	ВЭЖХ		$4,60 \pm 0,34$	0,03
Белая фасоль	Спектрофотометрия	90	$79,00 \pm 5,90$	0,03
	Флуориметрия		$79,50 \pm 3,95$	0,02
	ВЭЖХ		$81,2 \pm 6,05$	0,03

Результаты полученных дисперсий и средних результатов определения фолиевой кислоты сравнивали с помощью

теста Фишера и модифицированного теста Стьюдента (табл. 7).

Таблица 7. Сравнение дисперсий и средних результатов определения ФК в образце коровьего молока с помощью распределения Фишера и модифицированного теста Стьюдента ($n = 3$, $P = 0,95$)

Table 7. Comparison of dispersions and mean PK results in a cow's milk sample by Fisher distribution and modified Student test ($n = 3$, $P = 0.95$)

Метод анализа	Метод сравнения	$F_{эксп}$	$t_{эксп}$
Колориметрия	Флуориметрия	1,1	1,38
Флуориметрия	ВЭЖХ	2,35	1,10
ВЭЖХ	Колориметрия	2,46	2,12

Сравнение значений рассчитанных критериев с табличными критериями

свидетельствует об отсутствии статистически значимой ошибки, а следовательно, результаты достоверны.

Выводы

По результатам данной работы предложены методики флуориметрического, спектрофотометрического с предварительной дериватизацией и хроматографического определения фолиевой кислоты, характеризующиеся хорошей

чувствительностью и воспроизводимостью. Статистическая обработка результатов апробации предложенных методик свидетельствует о достоверности получаемой информации, что позволяет рекомендовать методики для лабораторий контроля качества продуктов питания.

Список литературы

1. Suvorov N. V., Mironov A. F., Green M. A. Folic acid and its derivatives for targeted photodynamic therapy of cancer // Russ. Chem. Bull. 2017. Vol. 66. С. 1982–2008. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1973-7>
2. Анализ фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ / А. С. Алексеева, М. В. Гаврилин, Т. Б. Шемерянкина, М. С. Смирнова, Е. П. Федорова, Т. М. Каргина, О. О. Новиков, С. А. Ковалева, Н. Н. Бойко // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2021. Т. 11, № 3. С. 185–192. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-185-192>
3. Наноструктурированная фолиевая кислота и ее применение для получения функциональных продуктов питания для женщин 20–35 лет / А. А. Кролевец, С. Г. Глотова, Е. М. Мамаева, К. В. Голубкова // Товаровед продовольственных товаров. 2020. № 10. С. 60–65. <https://doi.org/10.33920/igt-01-2010-08>
4. Кушнир А. А., Суханов П. Т., Сизо К. О. Определение ноотропов в лекарственных средствах, биологических объектах и пищевых добавках (обзор) // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2021. № 1. С. 5–19.
5. Nagaraja P., Vasantha R., Yathirajan H. Spectrophotometric determination of folic acid in pharmaceutical preparations by coupling reactions with iminodibenzyl or 3-aminophenol or sodium molybdate-pyrocatechol // Anal Biochem. A. 2002. Vol. 307(2). P. 316–321. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00038-6)
6. Jasim N. New approach for the on-line spectrophotometric determination of folic acid in pure and pharmaceutical preparation via oxidation by cerium (IV) sulphate using ayah 3Sx3-3D-Solar Cell CFI spectrophotometer analyzer // Iraqi Journal of Science A. 2014. Vol. 55(3). P. 1153–1163.
7. Рязанова А. П. Флуориметрическое определение фолиевой кислоты в лекарственных препаратах // Бюллетень медицинских интернет-конференций 2019. Т. 9, № 2. С. 81.

8. Таубэ А. А., Саканян Е. И. Флуориметрическая методика оценки количественного содержания кислоты фолиевой в составе препарата «Компливит» // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. Пятигорск: Пятигорск. гос. фармацевтическая акад., 2008, Вып. 63. С. 342–343.

9. Стромцова С. А., Карцова А. А. Метод ВЭЖХ при оценке содержания водо- и жирорастворимых витаминов в пищевых продуктах // Тезисы VIII Всероссийской конференции с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев-2014». СПб.: Изд-во МВА, 2014. С. 208–209.

10. Определение водорастворимых витаминов в витаминных премиксах, биологически активных добавках и фармацевтических препаратах методов ВЭЖХ с градиентным элюированием / А. А. Бендрышев, Е. Б. Пашкова, А. В. Пирогов, О. А. Шпигун // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2010. Т. 51, № 4. С. 315–324.

11. Chaudhary A., Wang J., Prabhu S. Development and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspirin and folic acid from nano-particulate systems // Biomed Chromatogr. A. 2010. Vol. 24(9). P. 919–925. <https://doi.org/10.1002/bmc.1386>

12. Определение водорастворимых витаминов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ с масс-селективным детектированием / А. А. Бендрышев, А. В. Пирогов, В. А. Колесов, Е. Б. Пашкова, А. В. Пирогов, О. А. Шпигун // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2010. Т. 76, № 8. С. 15–20.

13. Mohammad A., Zehra A. Anionic-nonionic surfactants coupled micellar thin-layer chromatography: synergistic effect on simultaneous separation of hydrophilic vitamins // J. Chromatogr. Science. 2010. Vol. 48, no. 2. P. 145–149. <https://doi.org/10.1093/chromsci/48.2.145>

14. Sreeram V. A., Basaveswara Rao M.V. Validated and stability indicating ultra high pressure liquid chromatographic method for folic acid in pharmaceutical preparation // International Journal of Chemical Studies A. 2013. Vol. 1. P. 17–27.

15. Pourjabbar Z., Pasandideh Y., Khorrami A. R. Solid-phase extraction and high performance liquid chromatographic determination of folic acid in fortified foodstuffs: a recommended process utilizing a new strong anion exchange sorbent // Journal of Analytical Chemistry. 2022. Vol. 77. P. 1027–1035. <https://doi.org/10.1134/S1061934822080196>

16. Определение фолиевой кислоты методом УВЭЖХ Polar RP. URL: <https://www.welch-us.com/determination-of-folic-acid-by-uhplc-polar-rp/> (дата обращения: 20.05.2022).

17. Phillips K., Ruggio D., Holden J. Folic acid content of ready-to-eat cereals determined by liquid chromatography-mass spectrometry: comparison to product label and to values determined by microbiological assay // Chemistry Cereal Chemistry. 2010. Vol. 87(1). P. 42–49. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-87-1-0042>

18. Справочник биохимика: пер. с англ. / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. М.: Мир, 1991. 543 с.
19. Экстракционное извлечение фолиевой кислоты водорастворимыми полимерами / О. В. Ерина, В. Ф. Селеменев, В. Ю. Хохлов, Г. В. Шаталов // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. 2009. Т. 52, № 9. С. 36–38.
20. Инихов Г. С., Брио Н. П. Методы анализа молока и молочных продуктов. М.: Пищевая промышленность, 1971. 423 с.

References

1. Suvorov N. V., Mironov A. F., Grin M. A. Folic acid and its derivatives for targeted photodynamic therapy of cancer. *Russ. Chem. Bull.*, 2017, vol. 66, pp. 1982–2008. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1973-7>
2. Alekseeva A. S., Gavrilin M. V., Shemeryankina T. B., Smirnova M. S., Fedorova E. P., Kargina T. M., Novikov O. O., Kovaleva S. A., Boyko N. N. Analiz folievoi kisloty v polivitaminnykh preparatakh metodom obrashchenno-fazovoi VEZhKh [Determination of Folic Acid in Multivitamin Preparations by Reversed Phase HPLC]. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*, 2021, vol. 11(3), pp. 185–192. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-185-192>
3. Krolevets A. A., Glotova S. G., Mamaeva E. M., Golubkova K. V. Nanostrukturirovannaya folievaya kislota i ee primeneniye dlya polucheniya funktsional'nykh produktov pitaniya dlya zhenshchin 20–35 let [Nanostructured folic acid and its use for the production of functional food products for women 20-35 years old]. *Tovaroved prodovol'stvennykh tovarov = Commodity expert of food products*, 2020, no. 10, pp. 60–65. <https://doi.org/10.33920/igt-01-2010-08>
4. Kushnir A. A., Sukhanov P. T., Sizo K. O. Opredeleniye nootropov v lekarstvennykh sredstvakh, biologicheskikh ob"ektakh i pishchevykh dobavkakh (obzor) [Determination of nootropics in medicines, biological objects and food additives (review)]. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2021, no. 1, pp. 5–19.
5. Nagaraja P., Vasantha R., Yathirajan H. Spectrophotometric determination of folic acid in pharmaceutical preparations by coupling reactions with iminodibenzyl or 3-aminophenol or sodium molybdate-pyrocatechol. *Anal Biochem.* A, 2002, vol. 307(2), pp. 316–321. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00038-6)
6. Jasim N. New approach for the on-line spectrophotometric determination of folic acid in pure and pharmaceutical preparation via oxidation by cerium (IV) sulphate using ayah

3Sx3-3D-Solar Cell CFI spectrophotometer analyzer. *Iraqi Journal of Science A*, 2014, vol. 55(3), pp. 1153–1163.

7. Ryazanova A. P. Fluorimetricheskoe opredelenie folievoi kisloty v lekarstvennykh preparatakh [Fluorimetric determination of folic acid in medicinal preparations]. *Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsii = Bulletin of medical Internet conferences*, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 81.

8. Taube A. A., Sakanyan E. I. Fluorimetricheskaya metodika otsenki kolichestvennogo sodrezhaniya kisloty folievoi v sostave preparata "Komplivit" [Fluorimetric methodology for assessing the quantitative content of folic acid in the composition of the drug "Complivit"]. *Razrabotka, issledovanie i marketing novoi farmatsevticheskoi produktsii. Sbornik nauchnykh trudov* [Development, research and marketing of new pharmaceutical products. Collection of scientific papers]. Pyatigorsk, Pyatigorsk St. Acad. Publ., 2008, is. 63, pp. 342–343.

9. Stromtsova S. A., Kartsova A. A. Metod VEZhKh pri otsenke sodrezhaniya vodo- i zhirorastvorimykh vitaminov v pishchevykh produktakh HPLC method for assessing the content of water- and fat-soluble vitamins in food products]. *Tezisy VIII Vserossiiskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem molodykh uchenykh po khimiii "Mendeleev-2014"* [Abstracts of the VIII All-Russian Conference with international participation of young scientists in chemistry "Mendeleev-2014"]. St. Petersburg, MBA Publ., 2014, pp. 208–209.

10. Bendryshev A. A., Pashkova E. B., Pirogov A. V., Shpigun O. A. Opredelenie vodorastvorimykh vitaminov v vitaminnykh premiksakh, biologicheskiiaktivnykh dobavkakh i farmatsevticheskikh preparatakh metodov VEZhKh s gradientnym elyuirovaniem [Determination of water-soluble vitamins in vitamin premixes, bioactive dietary supplements, and pharmaceutical preparations using high-efficiency liquid chromatography with gradient elution]. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2: Khimiya = Bulletin of the Moscow University. Series 2: Chemistry*, 2010, vol. 65(4), pp. 260–268.

11. Chaudhary A., Wang J., Prabhu S. Development and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspirin and folic acid from nano-particulate systems. *Biomed Chromatogr. A*. 2010, vol. 24(9), pp. 919–925. <https://doi.org/10.1002/bmc.1386>

12. Bendryshev A. A., Pirogov A. V., Kolesov V. A., Pashkova E. B., Pirogov A. V., Shpigun O. A. Opredelenie vodorastvorimykh vitaminov v pishchevykh produktakh metodom VEZhKh s masselektivnym detektirovaniem [Determination of water-soluble vitamins in food products by HPLC with mass-selective detection]. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov = Factory Laboratory. Diagnostics of materials*, 2010, vol. 76(8), pp. 15–20.

13. Mohammad A., Zehra A. Anionic-nonionic surfactants coupled micellar thin-layer chromatography: synergistic effect on simultaneous separation of hydrophilic vitamins.

14. Sreeram V. A., Basaveswara Rao M. V. Validated and stability indicating ultra high pressure liquid chromatographic method for folic acid in pharmaceutical preparation. *International Journal of Chemical Studies A*, 2013, vol. 1, pp. 17–27.

15. Pourjabbar Z., Pasandideh Y., Khorrami A. R. Solid-phase extraction and high performance liquid chromatographic determination of folic acid in fortified foodstuffs: a recommended process utilizing a new strong anion exchange sorbent. *Journal of Analytical Chemistry*, 2022, vol. 77, pp. 1027–1035. <https://doi.org/10.1134/S1061934822080196>

16. Opređenje folievoi kisloty metodom UVEZhKh Polar RP [Determination of folic acid by HPLC Polar RP. Available: <https://www.welch-us.com/determination-of-folic-acid-by-uhplc-polar-rp/> (accessed 20.05.2022)

17. Phillips K., Ruggio D., Holden J. Folic acid content of ready-to-eat cereals determined by liquid chromatography-mass spectrometry: comparison to product label and to values determined by microbiological assay. *Chemistry Cereal Chemistry*, 2010, vol. 87(1), pp. 42–49. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-87-1-0042>

18. Donon R., Elliot D., Elliot W., Jones K. Spravochnik biokhimika [Biochemist's Handbook]. Moscow, Mir Publ., 1991. P. 359.

19. Obraznik O. V., Selemenev V. F., Khokhlov V. Yu., Shatalov G. V. Ekstraktsionnoe izvlechenie folievoi kisloty vodorastvorimymi polimerami [Extractive extraction of folic acid by water-soluble polymers]. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Seriya: Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya = Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Series "Chemistry and Chemical Technology"*, 2009, vol. 52(9), pp. 36–38.

20. Inikhov G. S., Brio N. P. Metody analiza moloka i molochnykh produktov [Methods of analysis of milk and dairy products]. Moscow, Pishchevaya promyshlennost' Publ., 1971.

Информация об авторах / Information about the Authors

Мелихова Елена Владимировна, кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры химии, Липецкий государственный технический университет, г. Липецк, Российская Федерация,
e-mail: mev80@yandex.ru
ORCID: 0000-0002-6256-2848

Elena V. Melikhova, Cand. of Sci. (Chemistry), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Chemistry, Lipetsk State Technical University, Lipetsk, Russian Federation,
e-mail: mev80@yandex.ru
ORCID: 0000-0002-6256-2848

Егоров Геннадий Александрович, инженер,
Липецкий государственный технический
университет, г. Липецк,
Российская Федерация,
e-mail: egorov_ga53@mail.ru
ORCID: 0000-0002-8724-4408

Gennady A. Egorov, Engineer,
Lipetsk State Technical University,
Lipetsk, Russian Federation,
e-mail: egorov_ga53@mail.ru
ORCID: 0000-0002-8724-4408

Лазуткина Елизавета Игоревна, студент,
Липецкий государственный
технический университет, г. Липецк,
Российская Федерация,
e-mail: lizusik.lazutkina@yandex.ru,
ORCID: 0000-0002-5869-7117

Elizaveta I. Lazutkina, Student,
Lipetsk State Technical University,
Lipetsk, Russian Federation,
e-mail: lizusik.lazutkina@yandex.ru,
ORCID: 0000-0002-5869-7117

Елфимова Александра Викторовна, студент,
Липецкий государственный технический
университет, г. Липецк, Российская
Федерация,
e-mail: aleks.elfimova@gmail.com,
ORCID: 0000-0001-7765-2961

Alexandra V. Yelfimova, Student of the
Department of Chemistry,
Lipetsk State Technical University,
Lipetsk, Russian Federation,
e-mail: aleks.elfimova@gmail.com,
ORCID: 0000-0001-7765-2961