



**ЗАКЛЮЧЕНИЕ СПЕЦИАЛИСТА
по результатам химического исследования**

№04-03/16

от «04» апреля 2016 г.

«09» марта 2016 г., 10 час. 00 мин.
(дата, время начала производства исследования)

«04» апреля 2016 г., 18 час. 00 мин.
(дата, время окончания производства исследования)

г. Москва
(место производства исследования)

Основание производства исследования:

Запрос от ООО «Дело» №04-03/16 от 04.03.2016 г.

Специалист, выполнивший исследование:

Топилин Сергей Васильевич



ВВОДНАЯ ЧАСТЬ.

I. «04» марта 2016 года в ООО «Центр химических исследований» поступил запрос от ООО «Дело» на проведение химического исследования.

II. При запросе на исследование представлены материалы:

Концентрат микроводоросли «Живая Хлорелла».

III. На разрешение специалиста поставлена следующая задача:

1. Количественное определение:

- Аминокислот: валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, триптофан, лизин, фенилаланин, аргинин, гистидин, глутамин, глицин, аланин, пролин, серин, цистин, аспарагин, тирозин и др.

- Полиненасыщенных жирных кислот: арахидоновой (омега-6), линолевой (омега-6), линоленовой, докозагексаеновой (Омега-3).

- Пальмитиновой, олеиновой, пальмитолеиновой, стеариновой, миристиновой, пентадекановой, α -линолевой (Омега-3), эруковой кислот.

- Клетчатки;

- Витаминов (альфа-каротина, бета-каротина, витамина В1, В2, В6, В12, С, провитамина D, К, РР, Е, фолиевой кислоты, пантотеновой кислоты, биотина, лейковорина).

- Минералов: кальция, калия, меди, фосфора, магния, йода, железа, цинка, кобальта, марганца, циркония, рубидия, серы и др.

2. Качественное определение:

- Антиоксидантов (флавоноидов и изофлавоноидов)

- Хлорофилл типов А и Б

- Каротиноидов (Лютеина, Зеаксантина);

IV. Проведение исследования поручено Топилину Сергею Васильевичу.

Сведения о специалисте: Топилин Сергей Васильевич, химик – – судебный эксперт, имеющий высшее химическое образование (Диплом Ростовского государственного университета ДВС № 0886528, 2001 г), прошедший повышение квалификации по программе подготовки негосударственных судебных экспертов в Палате судебных экспертов по специальности: «Основы судебной экспертизы», 2012г.), стаж работы по специальности – с 2001 года (свыше 14 лет).

V. Сведения об экспертном учреждении:

Специалист:

С. В. Топилин

Центр химических исследований
ООО «ЛХИ»

Стр. 2

Общество с ограниченной ответственностью «Центр химических исследований» (ООО «ЦХИ») зарегистрировано в установленном порядке. Свидетельство о государственной регистрации ОГРН 1137746231314.

ООО «Центр химических исследований» осуществляет деятельность на основании Устава и действующего законодательства Российской Федерации. Проведение химических исследований и экспертиз является уставной деятельностью организации.

Организация «Центр химических исследований» сертифицирована в соответствии с международным стандартом ISO 9001 (сертификат соответствия RU.МСК.009.005.СМ.0516 действителен до 30.08.2018 г), а также в качестве судебно-экспертной организации в области «Экспертиза материалов, веществ и изделий из них», сертификат соответствия №241-10 (действителен по 10.11.2017 г.).

Юридический адрес: 115172, г. Москва, ул. М. Каменщики, д. 18, стр. 16

Телефон: 8(499)372-22-44. Интернет-сайт: центр-химических-исследований.рф. Адрес электронной почты: ccrlab@yandex.ru.

VI. Перечень оборудования:

1. ВЭЖХ / хроматомасс спектрометр Agilent 1200 Series;
2. Сушильный шкаф ШС-80-01;
3. Микрошприц Hamilton, объем 25 мкл;
4. Мерные микрокапилляры;
5. Пластины для тонкослойной хроматографии Merck Silica gel 60 F254 и «Sorbfil»;
6. Спектрофотометр СФ-46;
7. Стеклянные палочки;
8. Пипетки;
9. Магнитная мешалка;
10. Мерные колбы;
11. Газовый хроматомасс спектрометр Shimadzu GCMS QP-2010Ultra;
12. Масс-пектрометр с индуктивно связанной плазмой ELAN-DRC-e;
13. Плитка нагревательная;
14. Обратный холодильник;
15. Аппарат Сокслета;
16. Камера для ТСХ;
17. Ультразвуковая ванна Ya Xun YX2100;
18. ВЭЖХ Hitachi 100-40/Perkin-Elmer LC-10 Fluorescence detector.

VI. Перечень использованной литературы:

1. Определение водорастворимых витаминов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ с масс-селективным детектированием. А.А. Бендрышев, В. А. Колесов, Е.Б. Пашкова, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун. – «Заводская лаборатория. Диагностика материалов» №8 – 2010.Т76 – с 15-20.
2. Сравнительный анализ каротиноидов облепихового масла методом тонкослойной хроматографии. Курегян А.Г., Печинский С.В., Карандеева Е.А. – Пятигорский медико-фармацевтический институт.
3. ГОСТ 31675-2012. Корма. Методы определения содержания сырой клетчатки с применением промежуточной фильтрации.
4. Разработка экспресс-метода определения каротиноидов в сырье растительного происхождения. Писарев Д.И., Новиков О.О., Романова Т.А. – Научные ведомости, серия Медицина. Фармация – 2010 - №22 (93) В 12/2 - с 119-122.
5. Практикум по биохимии растений. Плешков Б.П. – Изд. 2-е, доп. и перераб. – Изд.: Москва, «Колос» - 1976 г. - 256 с
6. Исследование биоразнообразия микроводорослей западной Сибири для применения в процессах получения биотоплива третьего поколения. А.В. Пилигаев, К.Н. Сорокина, А.В. Брянская, Е.А.Демидов, Р.Г. Кукушкин, Н.А. Колчанов, В.Н. Пармон, С.Е.Пельтек – Вавиловский журнал генетики и селекции – 2013 – том 17, №2 – стр.359-367.
7. Исследование жирных кислот травы ясменника распростерого (*Asperula Humifusa* (M.B.) Bess.). Юрченко Н.С., Ильина Т.В., Ковалева А.М. – GISAP Medical. Science, pharmacology.
8. Большой химический справочник. А.И. Волков И.М. Жарский. – Изд. Современная школа, 2005 г.
9. Газовая хроматография», Я. И. Яшин, Е. Я. Яшин, А. Я. Яшин «Москва, «Транслит», 2009 г.
10. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии. 2-е изд. Минск: Вышэйш. школа, 1976. - 288 с.
11. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. Сычев К.С. - Москва: Техносфера, 2010. - 272 с.
12. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография - Е.Л.Стыскин, Л.Б.Ициксон, Е.В.Брауде.



ИССЛЕДОВАНИЕ

Описание объекта исследования.

Объект исследования представляет собой водную суспензию с частицами темно-зеленого цвета. Объект предоставлен в стеклянной бутылке объемом 250 мл. На бутылке имеется этикетка, на которой указано название объекта «Биологически активная добавка к пище концентрат микроводоросли Живая Хлорелла», также указан состав, срок годности, рекомендации к применению, противопоказания, фирма-изготовитель.

Внешний вид образца представлен на фотографиях в приложении 1.

Методы.

- Высоко-эффективная жидкостная хроматография с масс-сективным детектором. Наиболее перспективный аналитический вариант классической колоночной хроматографии в современном приборном исполнении. ВЭЖХ позволяет проводить одновременное разделение сложных проб на составляющие их компоненты, детектирование большинства компонентов, измерение концентрации одного или нескольких соединений (в зависимости от конкретных аналитических задач и наличия стандартных образцов). Детектирование может осуществляться, как и при газохроматографическом методе, так и при помощи масс-селективного детектора.

- Высоко-эффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектором.

- Тонкослойная хроматография. Метод, основанный на использовании тонкого слоя адсорбента в качестве неподвижной фазы. Основан на том, что разделяемые вещества по-разному распределяются между сорбирующим слоем и протекающим через него элюентом (смеси растворителей), вследствие чего, расстояние, на которое эти вещества смещаются по слою за одно и то же время, различается. После элюирования разделяемые вещества смеси располагаются на поверхности пластинки в определённых положениях (величина R_f).

- Спектрофотометрия - метод исследования и анализа веществ, основанный на измерении спектров поглощения в оптической области электромагнитного излучения.

- Газовая хроматография с масс-селективным детектором. Метод основан на внесении раствора пробы в испаритель посредством газового шприца. Внесенная проба под действием повышенной температуры испаряется и попадает в хроматографическую колонку, где происходит разделение компонентов пробы. Разделенные компоненты попадают в масс-

селективный детектор, где происходит идентификация веществ, основанная на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации представляющих интерес компонентов пробы. Обработка полученных данных производится при помощи программного обеспечения.

- Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. Индуктивно связанная плазма, поддерживаемая в специальной горелке, способна эффективно возбуждать однозарядные ионы из атомов вводимого образца. Далее ионы фокусируются ионно-оптической системой (отделяются от полиатомных и изобарных ионов в специальных моделях приборов) и попадают в анализатор масс-спектрометра, где разделяются по отношению массы к заряду. Соответствующий ионный поток регистрируется детектором.

Исследование по задаче 1. Количественное определение:

- Аминокислот;
- Полиненасыщенных жирных кислот: арахидоновой (омега-6), линолевой (омега-6), линоленовой, докозагексаеновой (Омега-3).
- Пальмитиновой, олеиновой, пальмитолеиновой, стеариновой, миристиновой, пентадекановой, α -линолевой (Омега-3), эруковой кислот.
- Клетчатки;
- Витаминов;
- Минералов.

Образец БАД представлен в виде суспензии, что усложняет качественное и количественное определение. Поэтому образец БАД был упарен досуха в сушильном шкафу при температуре $105 \pm 2^\circ\text{C}$. Массовая доля сухого вещества в образце 1,76%.

Определение качественного аминокислотного состава проведено методом бумажной хроматографии. Определение количественного аминокислотного состава образца было проведено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для определения наличия аминокислот в составе образца делали распределительную хроматографию аминокислот на бумаге. Метод основан на различной степени распределения компонентов смеси между двумя несмешивающимися жидкими фазами (неподвижной водной фазой и подвижной фазой органического растворителя). Органический растворитель проходя через полоску фильтровальной бумаги, увлекает за собой аминокислоты, раствор которых был нанесен на бумагу. Различные аминокислоты передвигаются по бумаге с неодинаковой скоростью. Скорость перемещения аминокислот зависит от многих факторов: строения молекулы

аминокислот, их способности легче растворяться в органическом растворителе или в воде, избирательной адсорбции на бумаге, типа бумаги, условий проведения анализа и т.д. чем лучше растворяется аминокислота в органическом растворителе, тем больший путь она пройдет с ним по бумаге.

Положения аминокислот на бумаге устанавливают, рассматривая хроматограмму в ультрафиолетовых лучах. Пятна отчетливо флуоресцируют в ультрафиолете.

Готовилась подвижная фаза: смешивались n-бутанол, ледяная уксусная кислота и вода в соотношении 4:1:1.

На полоску фильтровальной бумаги наносилось пятно водного раствора образца(экстракт) и высушивался на воздухе. Верхний конец полоски прокалывают и привязывают веревочку.

В пробирку заливали 1 мл подвижной фазы и помещали внутрь пробирки полоску фильтровальной бумаги с пятном образца так, чтобы полоска погружалась в раствор на 2-3 мм и закрепляли в висячем положении, закрыв пробирку пробкой. Через 1,5 часа фильтровальную бумагу вынули и перенесли в сушильный шкаф на 10 минут. После испарения растворителя полоску вынули и осматривали при ультрафиолетовом свете.

Таким образом, были обнаружены аминокислоты: фенилаланин, лизин, аргинин, гистидин, серин, треонин, глицин, аспаргиновая кислота, глутаминовая кислота, тирозин, метионин, пролин, валин, цистин.

Для проведения количественного определения навеску сухого вещества 3,07 г кипятили с обратным холодильником в 6М HCl в течение 24 часов. Для предотвращения распада аминокислот, содержащих серу, образец перед гидролизом (кипячением в в 6М HCl в течение 24 часов) обработали надмуравьиной кислотой, под действием которой цистин и цистеин превращаются в цистеиновую кислоту, а метионин в метионинсульфон, не разрушающиеся при кислотном гидролизе.

Полученный раствор анализировался методом высоко-эффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектором.

Анализ полученной хроматограммы показал присутствие аминокислот с последующим количественным определением по площадям полученных и идентифицированных пиков. Идентифицированные аминокислоты и их количество представлено в таблице 1.

Хроматограмма представлена в приложении 2.

Количественное определение триптофана анализировалось спектрофотометрическим с предварительным проведением щелочного

гидролиза. Измерение проводилось на фотоколориметре при длине волны 250 нм. Однако при таком анализе получают суммарное значение для триптофана, фенилаланина и тирозина. Для количественного определения триптофана из полученного значения были вычтены значения фенилаланина и тирозина, полученных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектором.

Таблица 1. Аминокислотный состав БАД «Живая хлорелла».

Аминокислотный состав	Содержание г (в 100 г сухого вещества)
Лейцин	4,48
Изолейцин	2,16
Лизин	5,31
Аланин	4,61
Пролин	3,03
Глицин	3,74
Глутамин	5,13
Треонин	1,88
Серин	2,1
Метионин	0,96
Валин	3,4
Фенилаланин	1,64
Триптофан	1,26
Аспарагин	4,3
Аргинин	7,95
Тирозин	0,53
Цистин	0,49
Гистидин	1,5

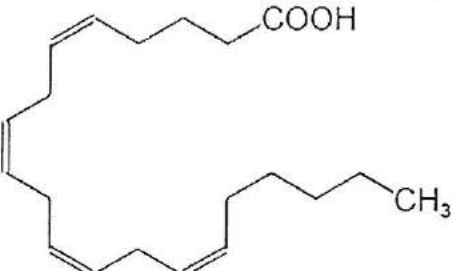
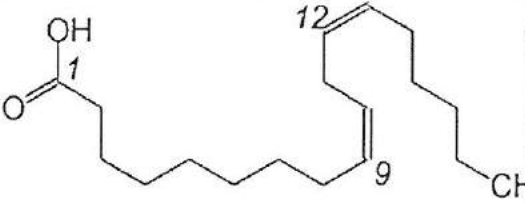
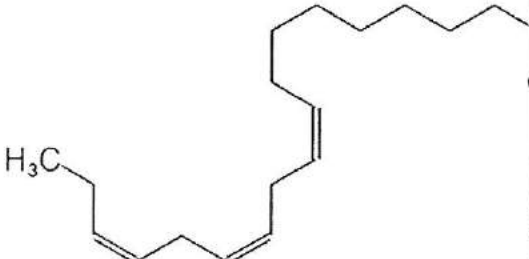
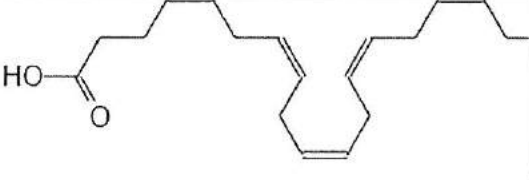
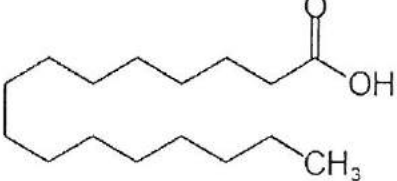
Для определения содержания насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в образце был применен метод газовой хроматографии с масс-селективным детектором с использованием калибровочного раствора образцов жирных кислот с известным содержанием.

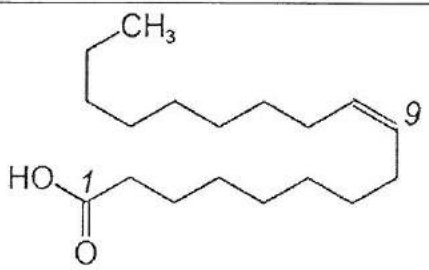
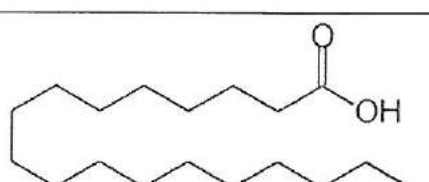
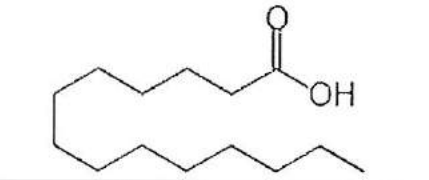
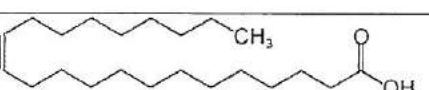
Экстракцию липидов проводили хлороформом при постоянном перемешивании в течении 24 часов. После экстракции к раствору добавляли 2,5 мл 0,9% раствора KCl и опять интенсивно перемешивали на магнитной мешалке. После расслоения раствора на две фазы, органическую фазу

отделяли на делительной воронке. Хлороформ упаривали в токе азота, к полученному раствору добавляли метанол и серную кислоту и перемешивали 48 часов. Полученный раствор промывали водой, отделяли органический слой и исследовали методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором в сравнении с калибровочным раствором жирных кислот.

Результаты хроматографического исследования представлены в таблице 2. Хроматограммы и масс-спектры представлены в приложении 3.

Таблица 2. Состав полиненасыщенных жирных кислот.

Жирные кислоты	Структурная формула	Содержание в образце БАД, мг/на 100 г сухого вещества
Арахидоновая кислота (омега-6) цис-5,8,11,14-эйкозатетраеновая кислота		Отсутствует
Линолевая кислота (омега-6) 9,12-октадекадиеновая кислота		659,3
Линоленовая кислота 9,12,15-октадекатриеновая кислота		3042
Докозагексаеновая кислота (Омега-3) (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-докоза-4,7,10,13,16,19-гексаеновая кислота		Отсутствует
Пальмитиновая кислота Гексадекановая кислота		612

Олеиновая кислота цис-9-октадеценовая кислота		Отсутствует
Пальмитолеиновая кислота цис-9-гексадеценовая кислота	$\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_7-\text{Z}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}_2\text{H}$	Отсутствует
Стеариновая кислота октадекановая кислота		Отсутствует
Миристиновая кислота тетрадекановая кислота		Отсутствует
Пентадекановая кислота	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}-\text{CO}_2\text{H}$	Отсутствует
Эруковая кислота цис-13-докозеновая кислота		Отсутствует
7,10-гексадекадиеновая кислота	-	301,2
7,10,13-гексадекатриеновая кислоты (Омега 3)	-	166,5

Линолевая, линоленовая, 7,10-гексадекадиеновая и 7,10,13-гексадекатриеновая кислоты являются незаменимыми и входят в состав комплекса витамина F.

Содержание клетчатки определить не представляется возможным по причине того, что образец исследования забивает нутч-фильтр. Определение проводили по методике описанной в ГОСТе 31675-2012 Корма. Методы определения содержания сырой клетчатки с применением промежуточной фильтрации. При проведении испытания при первом фильтровании сырая клетчатка загрязняла вплавленную фильтрующую пластину, несмотря на все меры предохранения, что делает невозможным определение содержания клетчатки.

Определение содержания витаминов в исследуемом образце проводилось при помощи метода высоко-эффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектором. Сухой остаток образца

экстрагировали спиртовым раствором, полученный раствор фильтровали и исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Условия проведения:

Элюент А: Дистиллированная вода.

Элюент Б: Ацетонитрил.

Градиент 90% Б - 5,5 мин; от 90 до 100% Б за 6,5 мин; 100% Б - 5 мин

Скорость подачи элюента: 100 мкл/мин.

Предпроба Элюент А

Объем предпробы 5 мкл

Длины волн детектора: 260, 270, 280, 290, 300 и 320 нм.

Время интегрирования: 0,34 с.

Температура: 35°C.

Затем сравнивали результаты хроматографического исследования испытуемого раствора с результатами хроматографии стандартного раствора, содержащего известную концентрацию витамина Е, D, К и А.

Хроматограммы исследования представлены в приложении 4.

В результате было выяснено, что содержание жирорастворимых витаминов в образце составляет:

Витамин	Содержание в образце, мг/100г сухого остатка
Токоферол (Е)	5,1351
Холекальциферол (D)	Отсутствует
Филлохинон (К)	Отсутствует
Ретинол (А)	Отсутствует

Сухой остаток образца заливали дистиллированной водой, отстаивали и центрифугировали. Полученный раствор фильтровали и исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Условия проведения:

Элюент А: Дистиллированная вода.

Элюент Б: Ацетонитрил

Градиент 6 мин 2% Б, от 2 до 25 % Б за 18 мин

Скорость подачи элюента: 100 мкл/мин.

Предпроба: Элюент А

Объем предпробы: 5 мкл

Длины волн детектора: 210, 220, 250, 260, 280 и 300 нм.

Время интегрирования: 0,34 с.

Температура: 35°C

Затем сравнивали результаты хроматографического исследования испытуемого раствора, с результатами хроматографии стандартного раствора, содержащего известные концентрации витаминов В₁ и В₂, В₃, В₆, В₁₂, С, фолиевой кислоты, пантотеновой кислоты.

Хроматограммы исследования представлены в приложении 5.

В результате было выяснено, что содержание водорастворимых витаминов в образце составляет:

Витамин	Содержание в образце, мг/100г сухого остатка
Тиамин (В ₁)	Отсутствует
Рибофлавин (В ₂)	1,1145
Пиридоксин (В ₆)	0,0542
Кобаламин (В ₁₂)	Отсутствует
Аскорбиновая кислота (С)	0,3675
Никотинамид (РР)	0,2199
Фолиевая кислота (В ₉)	0,5422
Пантотеновая кислота (В ₅)	2,500

Для определения количественного содержания минералов был проведен анализ методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Результаты проведенного исследования приведены в таблице 3.

Таблица 3. Элементный состав образца.

Элемент	ПО (предел обнаружения), мг/л	Содержание элементов в образце, мг/л	Погрешность определения, ±Δ, мг/л
Литий	0,0001	0,048	0,01
Бериллий	0,0002	<ПО	
Бор	0,001	0,7	0,14
Натрий	0,003	186	47
Магний	0,0005	264	53
Алюминий	0,0005	0,14	0,03
Фосфор	0,1	58	18
Калий	0,02	129	26
Кальций	0,1	175	70
Ваннадий	0,0	0,085	0,017
Хром (общий)	0,0005	1,03	0,26

Марганец	0,0001	15,5	3,1
Железо (общее)	0,0001	167	33
Кобальт	0,00005	0,74	0,11
Никель	0,0001	2,5	0,5
Медь	0,00005	3,4	0,7
Цинк	0,0005	2,6	0,5
Мышьяк	0,0002	0,023	0,007
Селен	0,002	0,007	0,002
Рубидий	0,00002	0,032	0,006
Стронций	0,00001	5,0	1,0
Молибден	0,00005	0,069	0,014
Серебро	0,00002	0,00039	0,00015
Кадмий	0,00005	0,0011	0,0002
Олово	0,00002	0,018	0,006
Сурьма	0,00002	0,0017	0,0007
Барий	0,00001	0,041	0,008
Вольфрам	0,0001	0,014	0,004
Таллий	0,00001	0,00018	0,00007
Свинец	0,00003	0,040	0,008
Висмут	0,00001	0,000047	

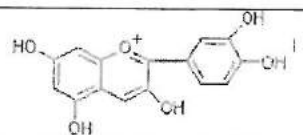
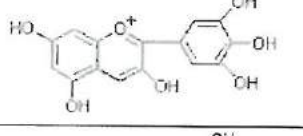
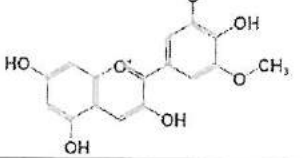
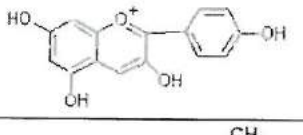
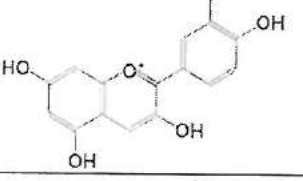
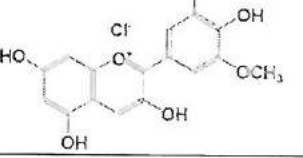
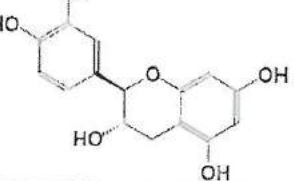
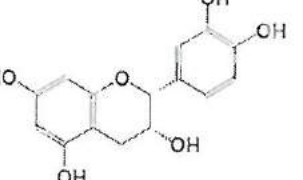
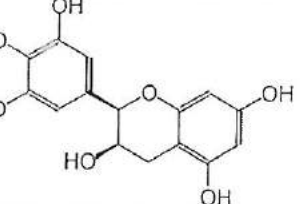
Исследование по задаче 2. Качественное определение:

- Антиоксидантов (флавоноидов и изофлавоноидов)
- Хлорофилл типов А и В
- Каротиноидов (Лютеина, Зеаксантина).

Для идентификации флавоноидов и изофлавоноидов в образце пищевого БАД, сухой остаток образца хлореллы был экстрагирован изопропиловым спиртом. Изопропанол является хорошим растворителем для большинства органических соединений. Для лучшей экстракции раствор хлореллы в изопропанолу озвучивался в ультразвуковой ванне. Раствор был декантирован и исследован методом высоко-эффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектором.

Хроматограмма, полученная при помощи УФ-детектора, имеет множество пиков.

Был проведен поиск флавоноидов и изофлавоноидов на масс-спектрах полученных пиков.

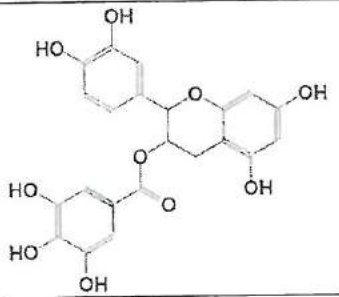
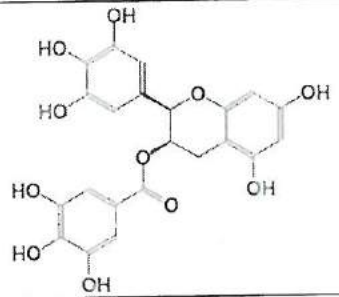
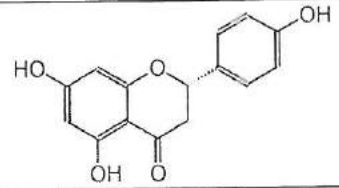
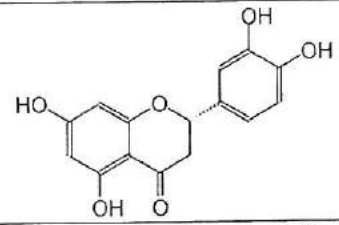
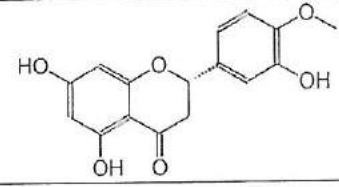
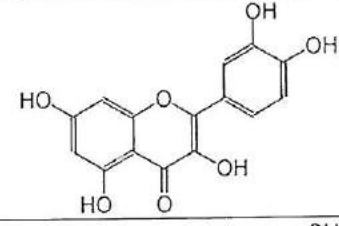
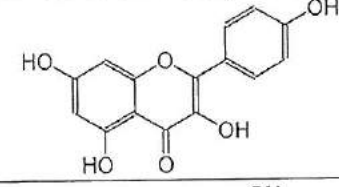
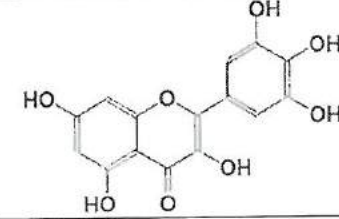
Название флавоноида/изофлавоноида	Структурная формула	М
Цианидин		287,246
Делфинидин		303,199
Малвидин		331,3
Пеларгонидин		271,248
Пеонидин		301,274
Петунидин		205,28
Катехин		290,271
Эпикатехин		290,271
Эпигаллокатехин		306,27

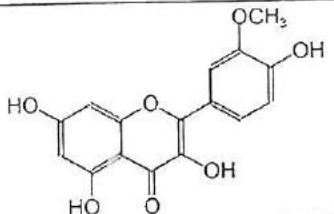
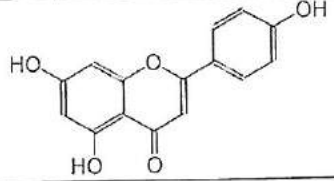
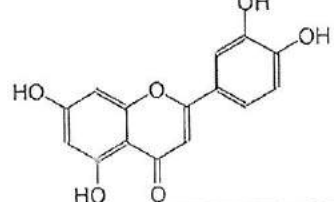
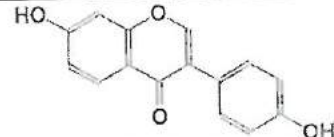
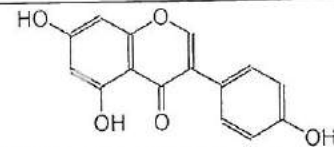
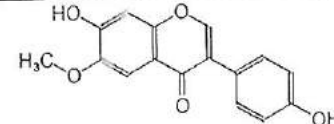
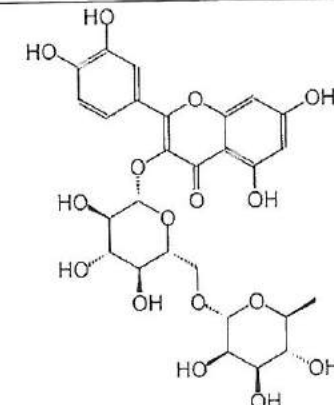
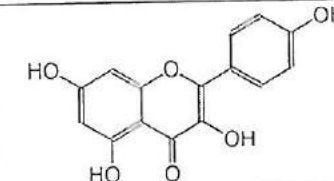
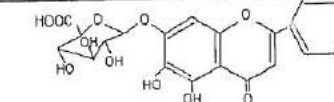
Специалист:

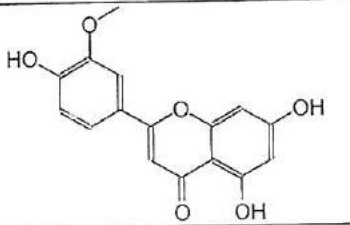
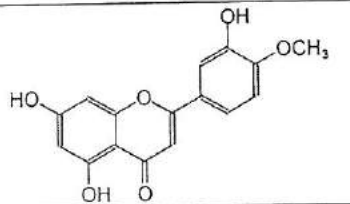
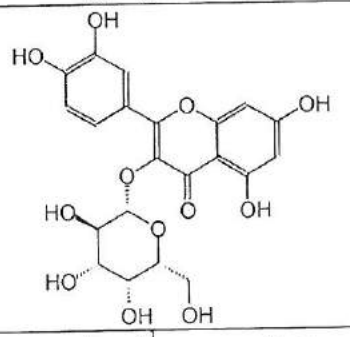
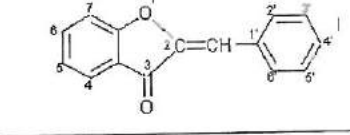
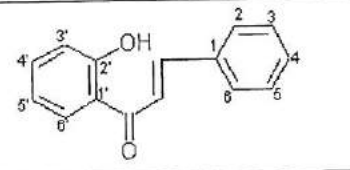
С. В. Топилин

Центр химических исследований
ООО «ЛХИ»

Стр. 14

Эпикатехингаллат		442.376
Эпигаллокатехингаллат		458.375
Нарингенин		272.256
Эриодиктиол		288.255
Гесперетин		302.282
Кверцетин		302.238
Кемпферол		286.239
Мирицетин		318.237

Изорамнетин		316.265
Апигенин		270.24
Лютеолин		286.239
Даидзеин		254.241
Генистеин		270.24
Глицитеин		284.267
Рутин		610.521
Кемпферол		286.239
Хризин		254,2375

Хризоериол		300.265
Диосметин		300.265
Гиперозид		464.379
Аурон		222.243
Халкон		208.26

Таким образом, на масс-спектрах образца БАД обнаружен антиоксидант рутин.

Хроматограммы и масс-спектры представлены в приложении 6.

Рутин относится к биофлавоноидам (витамин Р). Рутин, попадая в организм, действует как противоязвенное, гипоазотемическое, противовоспалительное, антиаллергическое, противоопухолевое, радиопротекторное, желчегонное средство, а также является ангиопротектором и корректором микроциркуляции. Рутин играет особую роль в микроциркуляциях крови и лимфы. Благодаря ему капилляры сохраняют эластичность и проходимость для биологических жидкостей.

Наличие в образце БАД «Живая хлорелла» хлорофилла А и хлорофилла Б определялось при помощи метода тонкослойной хроматографии. Для этого сухой остаток образца экстрагировался в этаноле

96% в течение 24 часов. Полученный раствор при рассмотрении имеет зеленый цвет в проходящем свете и вишнево-красный в отраженном.

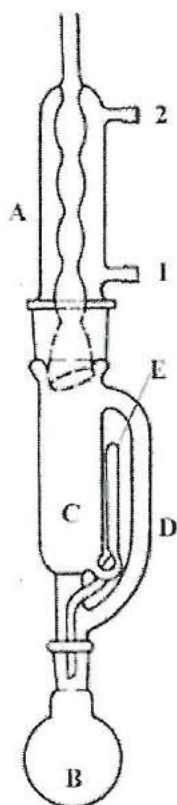
Для идентификации хлорофилла А и Б проводился анализ методом тонкослойной хроматографии. Полученный зеленый экстракт из образца исследования наносился на стартовую линию хроматографической пластины в количестве 5 мкл и высушивался при 80 °С в течение 3 минут. Далее проводилось хроматографирование на пластинах Merck Silica gel 60 F254 в системе элюентов гексан:ацетон в соотношении 6:2 и в системе ацетонитрил:водный раствор аммиака:уксусная кислота в соотношении 8:1:1 в предварительно насыщенных парами элюентов камерах. ТСХ-пластины сушили при комнатной температуре в течение 30 минут. Идентификация проводилась в видимом свете. Было обнаружено, что на хроматограмме присутствуют пятна светло-зеленого и светло-желтого цвета, что соответствует хлорофиллу А и хлорофиллу Б соответственно.

Хроматограммы исследования методом тонкослойной хроматографии представлены в приложении 6.

Таким образом, в образце пищевого БАД «Живая хлорелла» обнаружены хлорофилл А и хлорофилл Б.

Наличие в образце БАД «Живая хлорелла» каротиноидов определялось методом тонкослойной хроматографии. Для этого сухой остаток образца навеской 1,02 г экстрагировался гексаном в аппарате Сокслета в течение 8 часов, так как каротиноиды являются липофильными компонентами растений.

Схема аппарата Сокслета.



А – обратный холодильник. Холодная вода поступает через отверстие 1 и выходит через отверстие 2.

В – колба с растворителем.

С – средний сосуд аппарата Сокслета.

D – сообщающаяся трубка для прохода паров растворителя.

E – сифон, через который растворитель возвращается в колбу В.

Аппарат (экстрактор) Сокслета предназначен для экстракции нелетучих (или труднолетучих) веществ из твердых образцов с помощью летучих растворителей. Принцип действия экстрактора: растворитель испаряется из колбы, пар по боковой трубке (в обход патрона с веществом) попадает в

обратный холодильник и стекает на экстрагируемое вещество. Когда уровень растворителя в нижней части аппарата становится выше изгиба трубки сифона, растворитель скачкообразно стекает в колбу, где снова испаряется. Экстрагируемое вещество остается в колбе.

Полученный экстракт сгущали до небольшого объема и разбавляли ацетонитрилом в пропорции 1:3.

На хроматографическую пластинку «Sorbfil» наносили 10 мкл исследуемого раствора. Затем проводилось хроматографирование восходящим способом в подвижной фазе системе элюентов гексан:ацетон. После продвижения подвижной фазы до края пластинки, пластинку вынимали и сушили.

Каротиноиды идентифицировали по величинам коэффициентов подвижности, сравнивая их с опубликованными в литературе коэффициентами подвижности для данных хроматографических условий. В образце исследования были обнаружены зеаксантин и лютеин, имеющие коэффициент подвижности 0,314 и 0,371 соответственно.

Хроматограммы исследования методом тонкослойной хроматографии представлены в приложении 7.

Таким образом, в образце пищевого БАД «Живая хлорелла» обнаружены каротиноиды зеаксантин и лютеин.

Зеаксантин наряду с лютеином питает органы зрения человека и защищает их от преждевременного старения.



ВЫВОД

По результатам проведенного исследования специалист приходит к следующему заключению:

По задаче 1: Количественное определение:

- Аминокислот;
- Полиненасыщенных жирных кислот;
- Клетчатки;
- Витаминов;
- Минералов.

Аминокислотный состав БАД «Живая хлорелла» в сухом веществе:

- Лейцин – 4,48 г/100г сухого остатка;
- Изолейцин – 2,16 г/100г сухого остатка;
- Лизин – 5,31 г/100г сухого остатка;
- Аланин – 4,61 г/100г сухого остатка;
- Пролин – 3,03 г/100г сухого остатка;
- Глицин – 3,74 г/100г сухого остатка;
- Глутамин – 5,13 г/100г сухого остатка;
- Треонин – 1,88 г/100г сухого остатка;
- Серин – 2,1 г/100г сухого остатка;
- Метионин – 0,96 г/100г сухого остатка;
- Валин – 3,4 г/100г сухого остатка;
- Фенилаланин – 1,64 г/100г сухого остатка;
- Триптофан – 1,26 г/100г сухого остатка;
- Аспарагин – 4,3 г/100г сухого остатка;
- Аргинин – 7,95 г/100г сухого остатка;
- Тирозин – 0,53 г/100г сухого остатка;
- Цистин – 0,49 г/100г сухого остатка;
- Гистидин – 1,5 г/100г сухого остатка.

Жирнокислотный состав пищевого БАД «Живая хлорелла»:

- Линолевая кислота (омега-6) – 659,3 мг/100г сухого остатка;
- Линоленовая кислота – 3042 мг/100г сухого остатка;
- Пальмитиновая кислота – 612 мг/100г сухого остатка;
- 7,10-гексадекадиеновая кислота – 301,2 мг/100г сухого остатка;
- 7,10,13-гексадекатриеновая кислоты (Омега 3) – 166,5 мг/100г сухого остатка.

Определение клетчатки не представляется возможным по причине того что образец исследования БАД «Живая хлорелла» забивает нутч-фильтр.

В образце пищевого БАД «Живая хлорелла» обнаружены следующие витамины:

- Токоферол (E) – 5,1351 мг/100г сухого остатка;
- Рибофлавин (B₂) – 1,1145 мг/100г сухого остатка;
- Пиридоксин (B₆) – 0,0542 мг/100г сухого остатка;
- Аскорбиновая кислота (C) – 0,3675 мг/100г сухого остатка;
- Никотинамид (PP) – 0,2199 мг/100г сухого остатка;
- Фолиевая кислота (B₉) – 0,5422 мг/100г сухого остатка;
- Пантотеновая кислота (B₅) – 2,500 мг/100г сухого остатка.

В образце пищевого БАД «Живая хлорелла» обнаружены следующие элементы:

Элемент	Содержание элементов в образце, мг/л	Элемент	Содержание элементов в образце, мг/л
Литий	0,048	Цинк	2,6
Бериллий	<ПО	Мышьяк	0,023
Бор	0,7	Селен	0,007
Натрий	186	Рубидий	0,032
Магний	264	Стронций	5,0
Алюминий	0,14	Молибден	0,069
Фосфор	58	Серебро	0,00039
Калий	129	Кадмий	0,0011
Кальций	175	Олово	0,018
Ваннадий	0,085	Сурьма	0,0017
Хром (общий)	1,03	Барий	0,041
Марганец	15,5	Вольфрам	0,014
Железо (общее)	167	Таллий	0,00018
Кобальт	0,74	Свинец	0,040
Никель	2,5	Висмут	0,000047
Медь	3,4		

По задаче 2. Качественное определение:

- Антиоксидантов (флавоноидов и изофлавоноидов)
- Хлорофилл типов А и В
- Каротиноидов (Лютеина, Зеаксантина).

В образце пищевого БАД «Живая хлорелла» обнаружены следующие соединения:

- Рутин (антиоксидант);
- Хлорофилл А;
- Хлорофилл В;
- Лютеин;
- Зеаксантин.

Специалист



С.В. Топилин

Приложения.

Приложение 1. Внешний вид образца.

Приложение 2. Хроматографическое исследование аминокислотного состава образца.

Приложение 3. Хроматографическое исследование жирокислотного состава образца.

Приложение 4. Хроматографическое исследование жирорастворимых витаминов.

Приложение 5. Хроматографическое исследование водорастворимых витаминов.

Приложение 6. Хроматограммы и масс-спектры образца (идентификация антиоксидантов).

Приложение 7. Хроматограмма, полученная методом тонкослойной хроматографии (идентификация хлорофиллов).

Приложение 8. Хроматограмма, полученная методом тонкослойной хроматографии (идентификация каротиноидов).

Приложение 9. Копии документов, подтверждающих компетенцию специалиста.

Приложение 10. Сертификаты соответствия экспертного учреждения.

Специалист:

С. В. Топилин

Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 22

Приложения.

Приложение 1. Внешний вид образца.

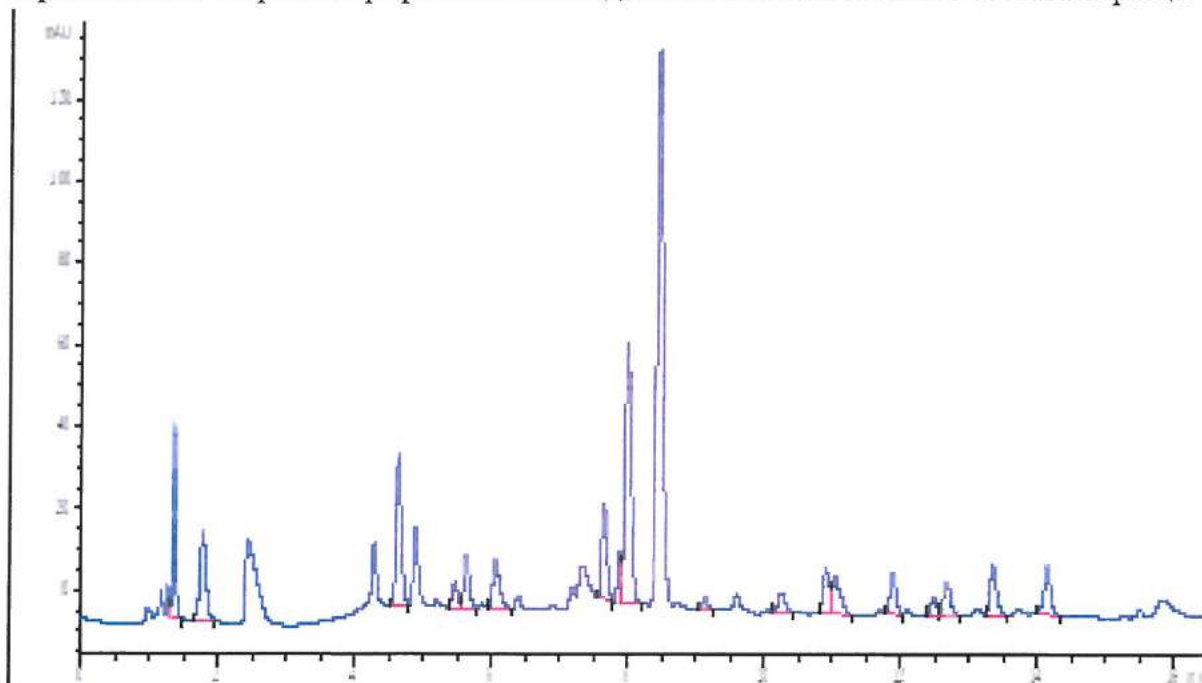


Специалист:

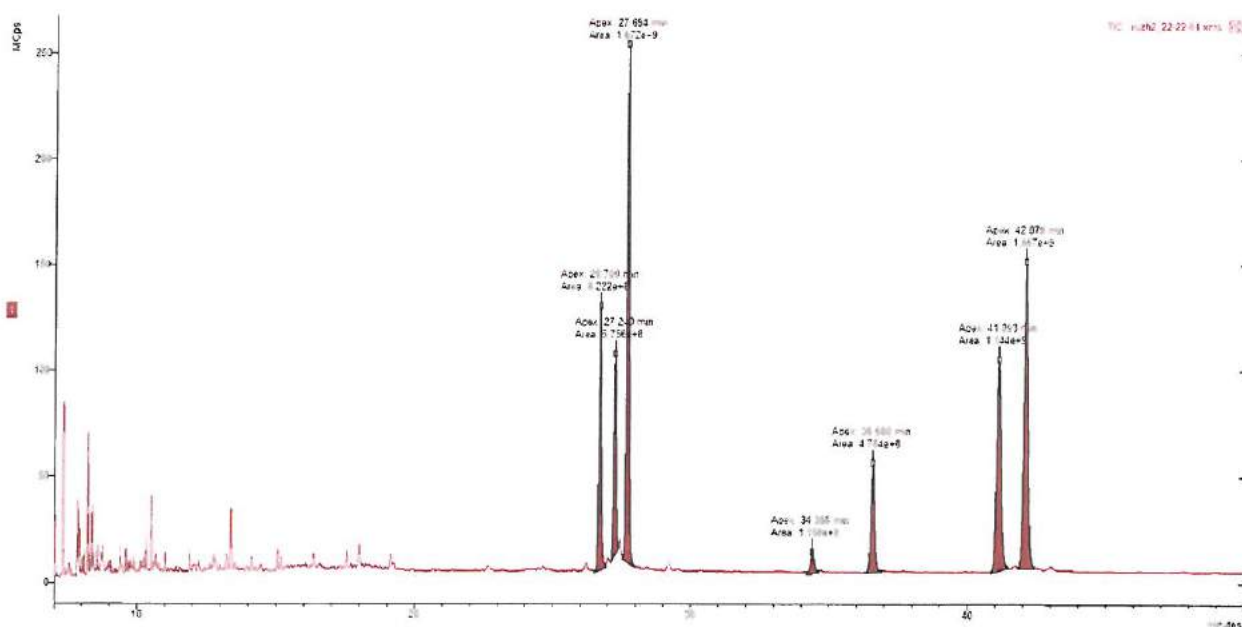
С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 23

Приложение 2. Хроматографическое исследование аминокислотного состава образца.



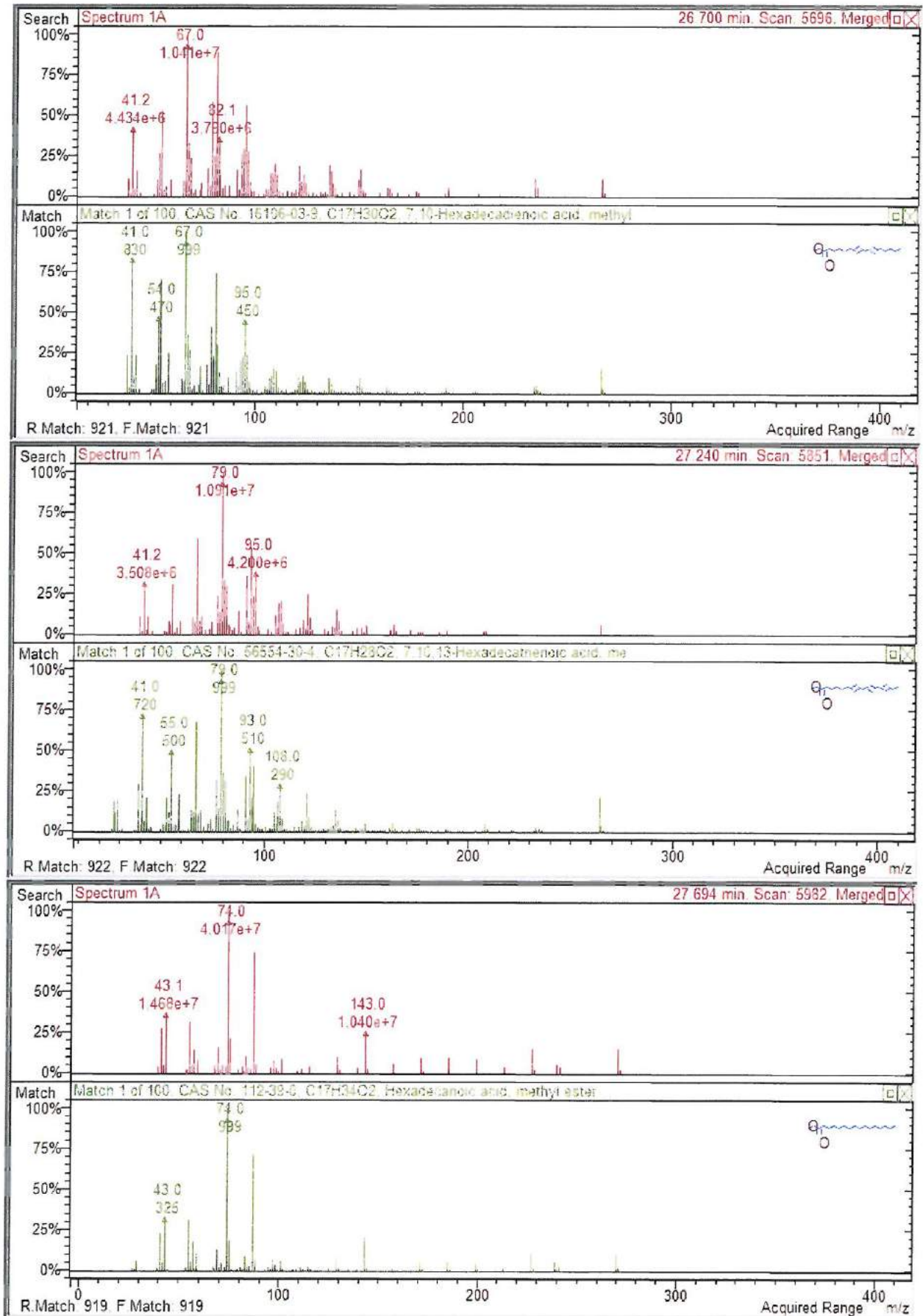
Приложение 3. Хроматографическое исследование жирокислотного состава образца.



Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

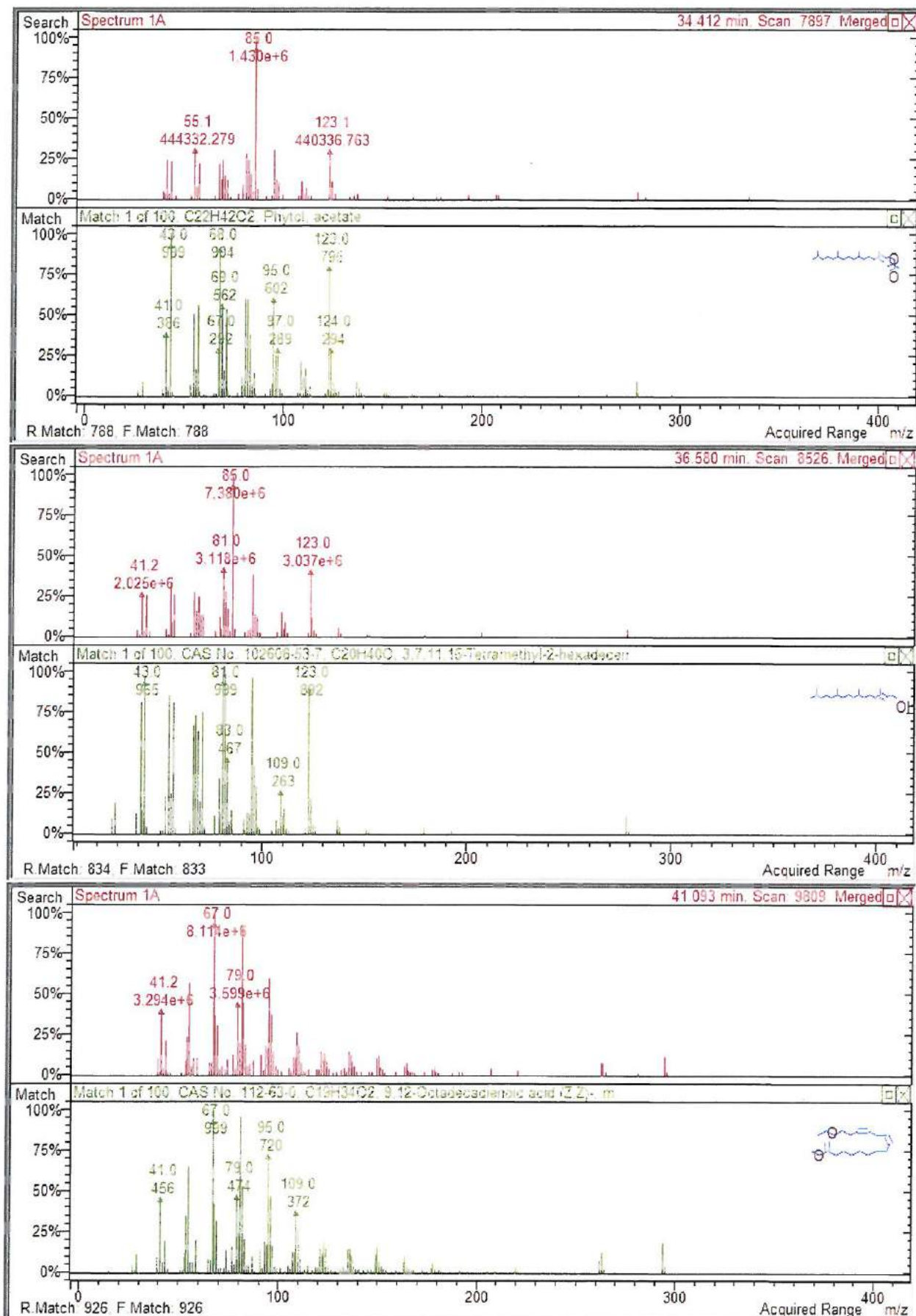
Стр. 24



Специалист:

С. В. Топилин
 Центр химических исследований
 ООО «ЦХИ»

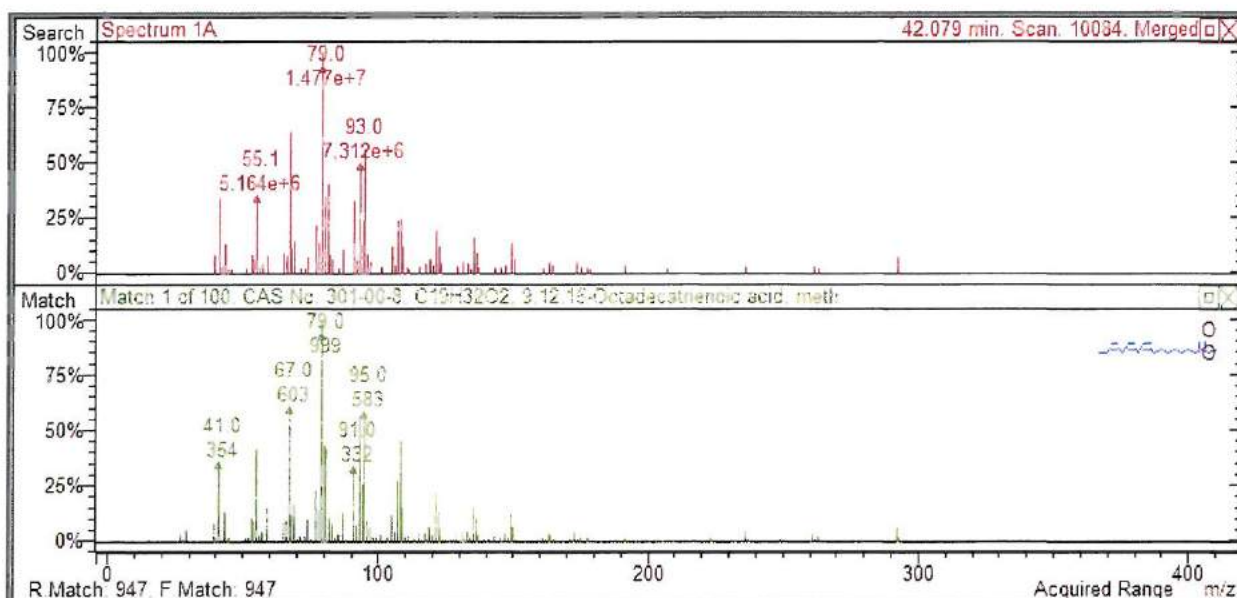
Стр. 25



Специалист:

С. В. Топилин
 Центр химических исследований
 ООО «ЦХИ»

Стр. 26



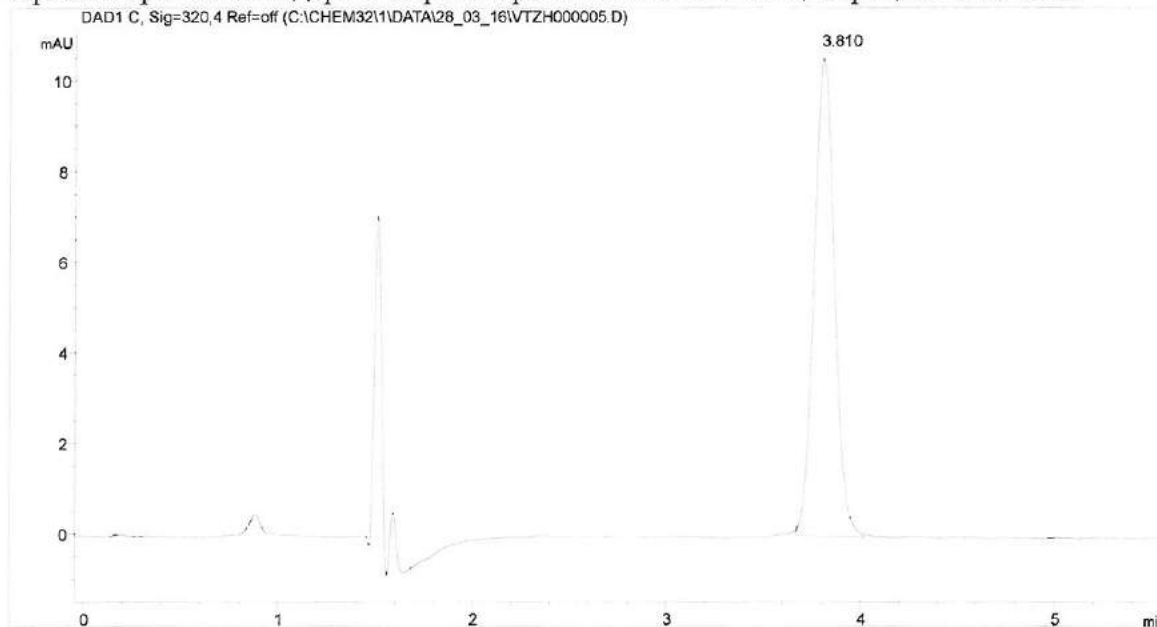
Приложение 4. Хроматографическое исследование жирорастворимых витаминов. колонка Zorbax SB-C18 250*4.6 (5 мкм), температура колонки 35 С.

Подвижная фаза - ацетонитрил: пропанол-1 в соотношении объемном 99:1, скорость потока 1 мл/мин.

Детектирование спектрофотометрическое для витамина А 320 нм, для витамина Е 290 нм.

Объем вводимой пробы 20 мкл

Хроматограмма стандартного раствора витамина А с концентрацией 0.88 мг/л

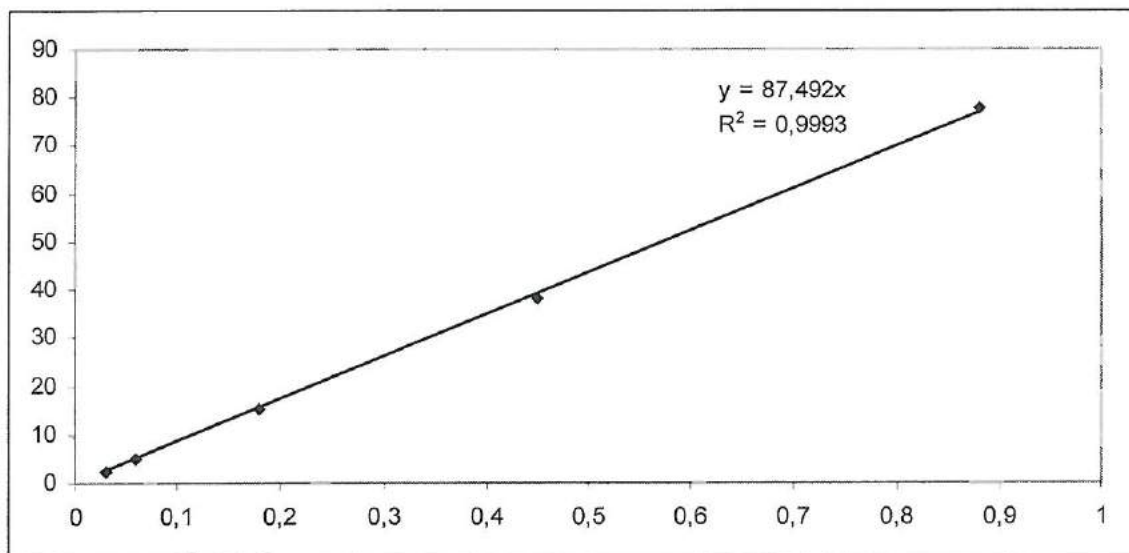


Градуировочная зависимость для Витамина А (в форме ацетата)

Специалист:

С. В. Топилин
 Центр химических исследований
 ООО «ЦХИ»

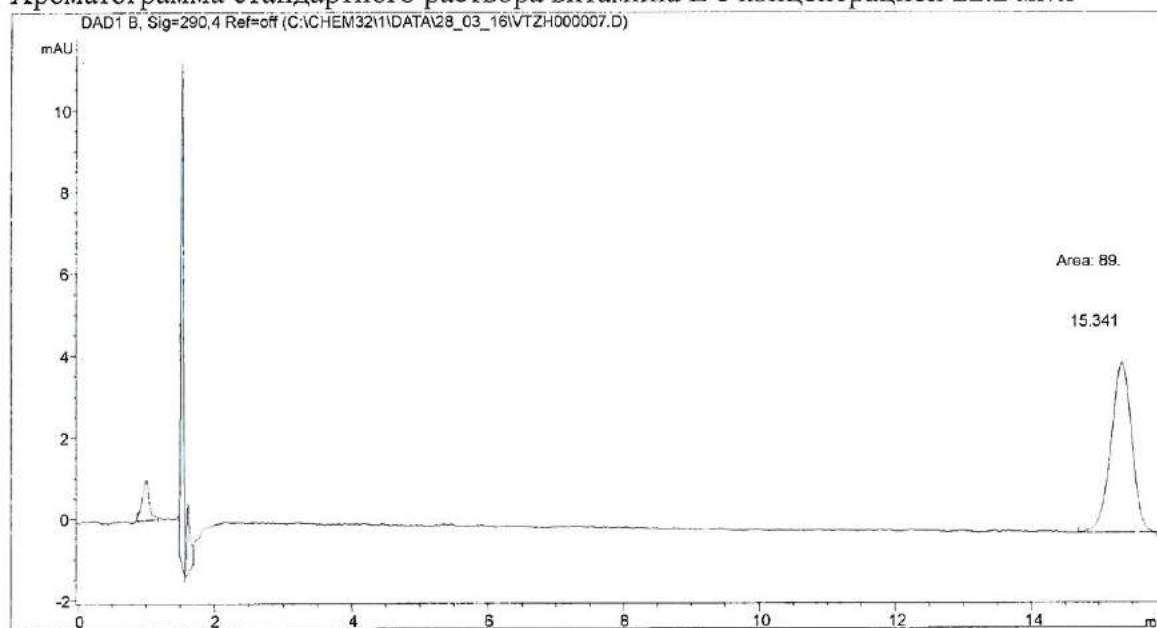
Стр. 27



Предел количественного определения составляет 0,03 мг/л.

Время удерживания 3,81 мин.

Хроматограмма стандартного раствора Витамина Е с концентрацией 22.2 мг/л



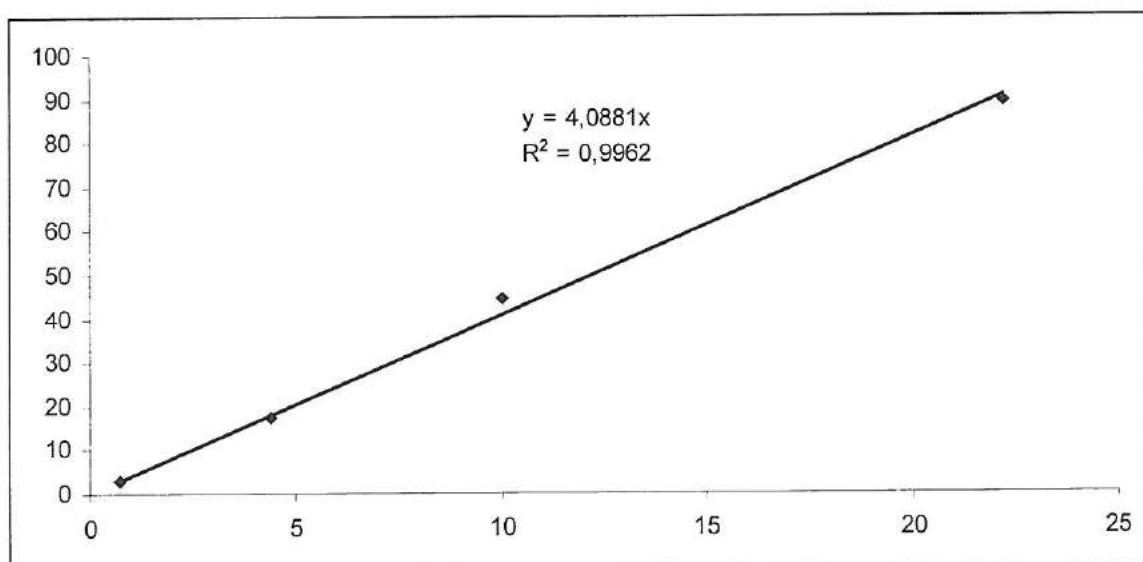
Градуировочная зависимость для Витамина Е (в форме ацетата)

Специалист:

С. В. Топилин

Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 28



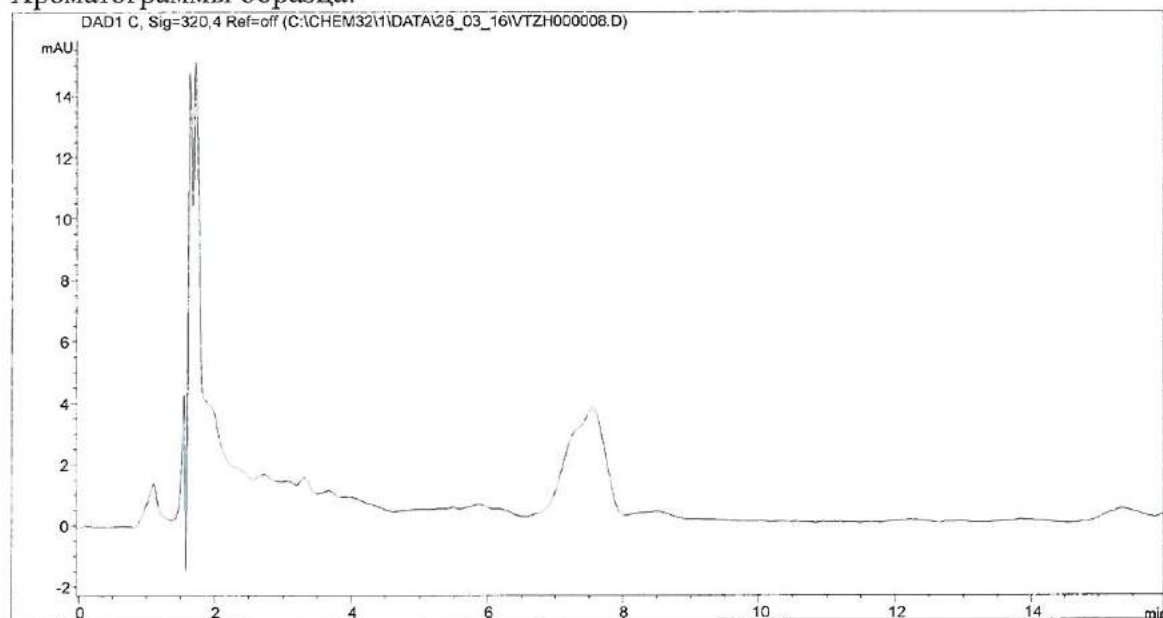
Предел количественного определения составляет 0,6 мг/л.
Время удерживания 15,34 мин.

Специалист:

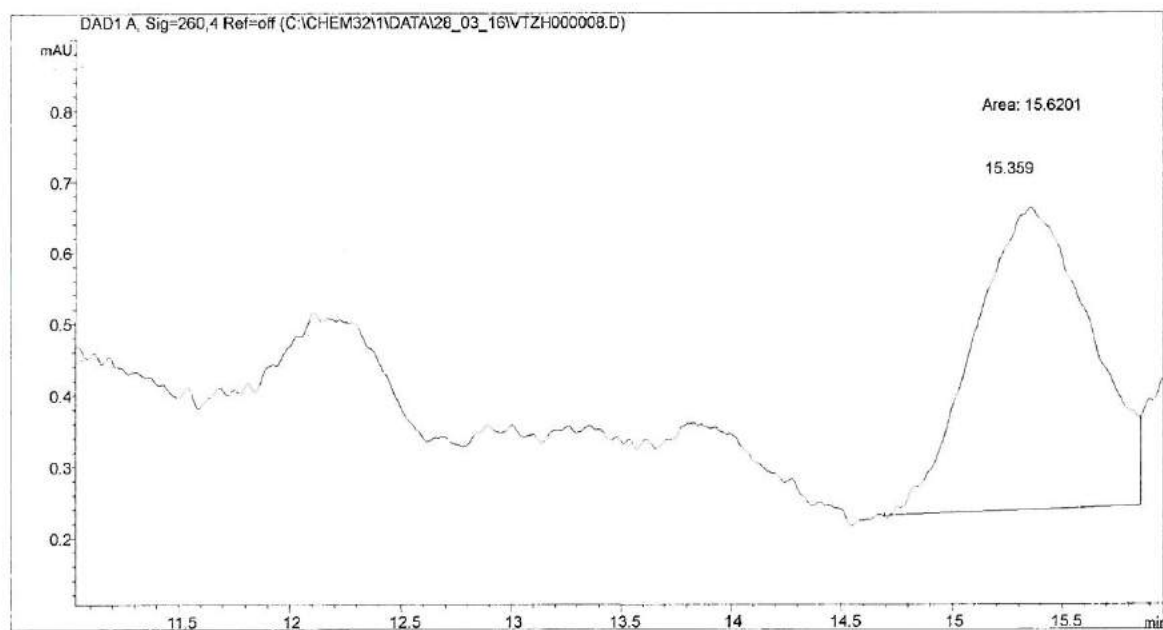
С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 29

Хроматограммы образца:



Витамина А не обнаружено



Содержание Е 3,8 мг/л

Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 30

Приложение 5. Хроматографическое исследование водорастворимых витаминов.

колонка Zorbax SB-C18 250*4.6 (5 мкм),

температура колонки 25 С.

Подвижная фаза: А- 0.1% муравьиная кислота, Б - ацетонитрил.

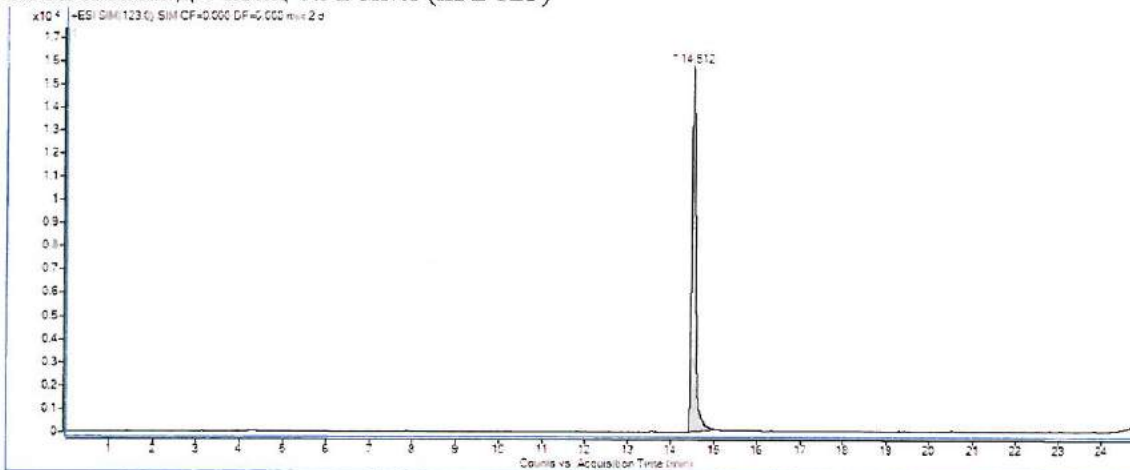
Градиентный профиль (по Б): 0-4.6 мин - 0%, 4.6-11 мин - от 0 до 18%, 10-17.8 мин - 18%, 17.5-18.4 мин от 18 до 60%, 18.4-19 мин - 60%, 19-19.6 от 60 до 0%.

Скорость потока 0.3 мл/мин.

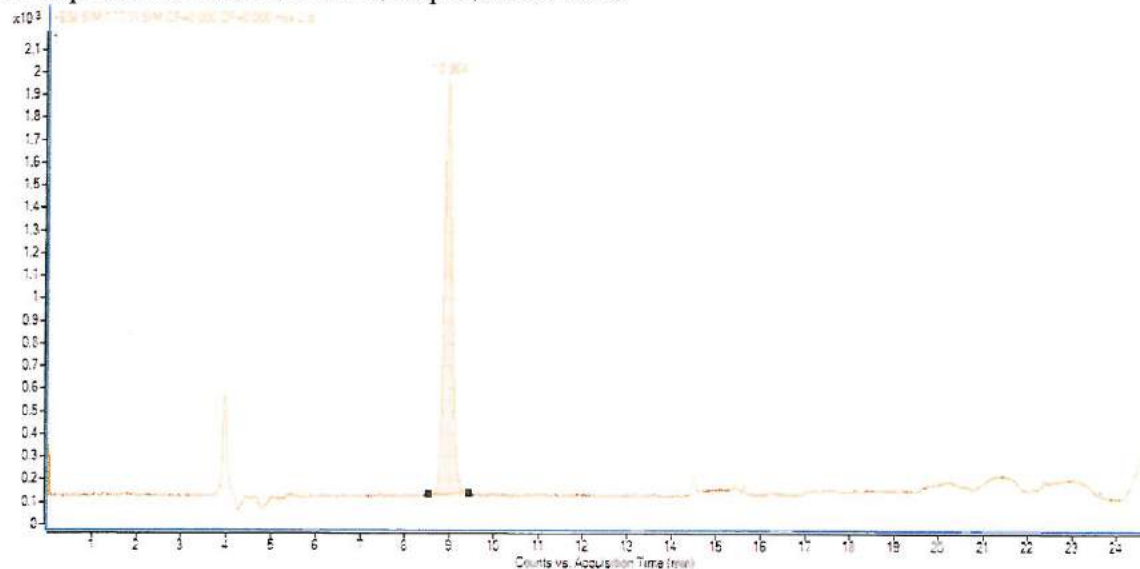
Регистрация в режиме выбранных ионов. Положительно заряженные ионы. Объем вводимой пробы 5 мкл.

Хроматограммы стандартных образцов

Никотинамид с конц 0.92 мг/л (m/z 123)



Аскорбиновая кислота концентрация 1.6 мг/л

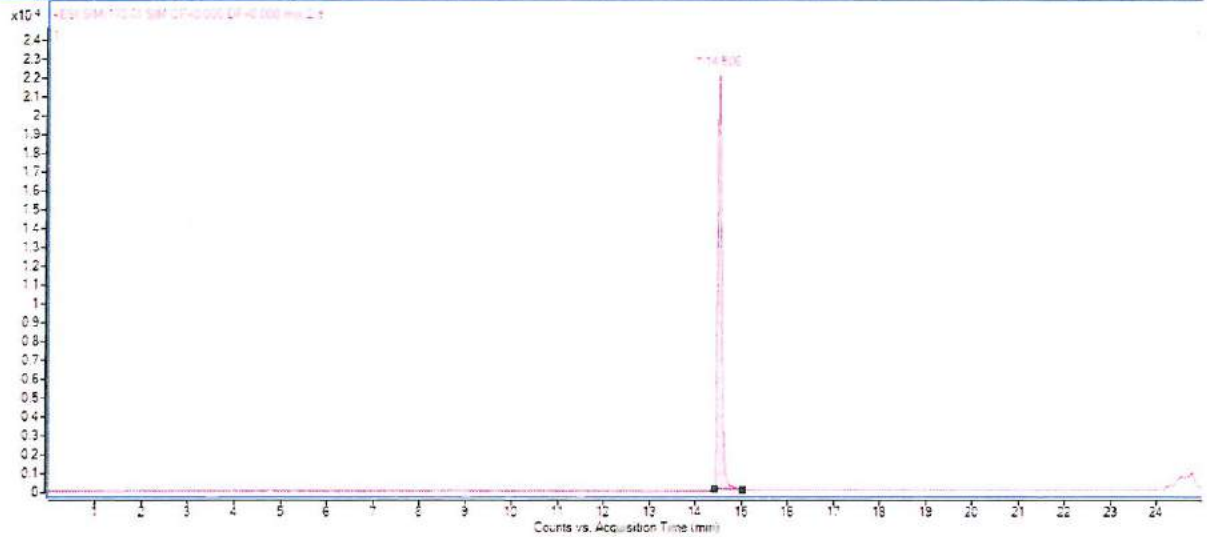


Специалист:

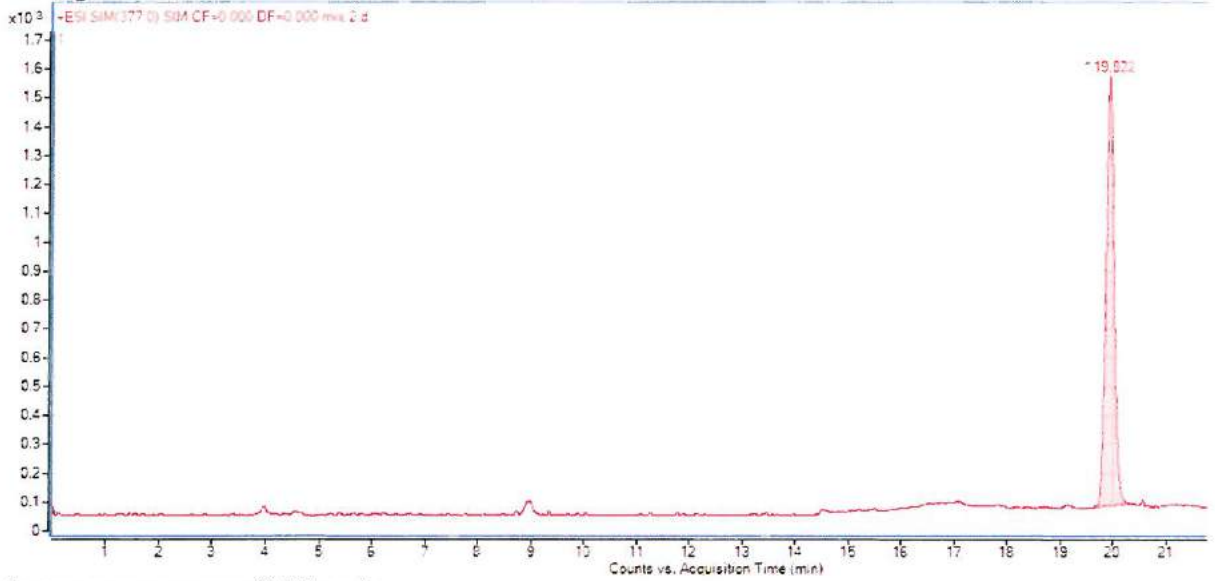
С. В. Топилин
 Центр химических исследований
 ООО «ЦХИ»

Стр. 31

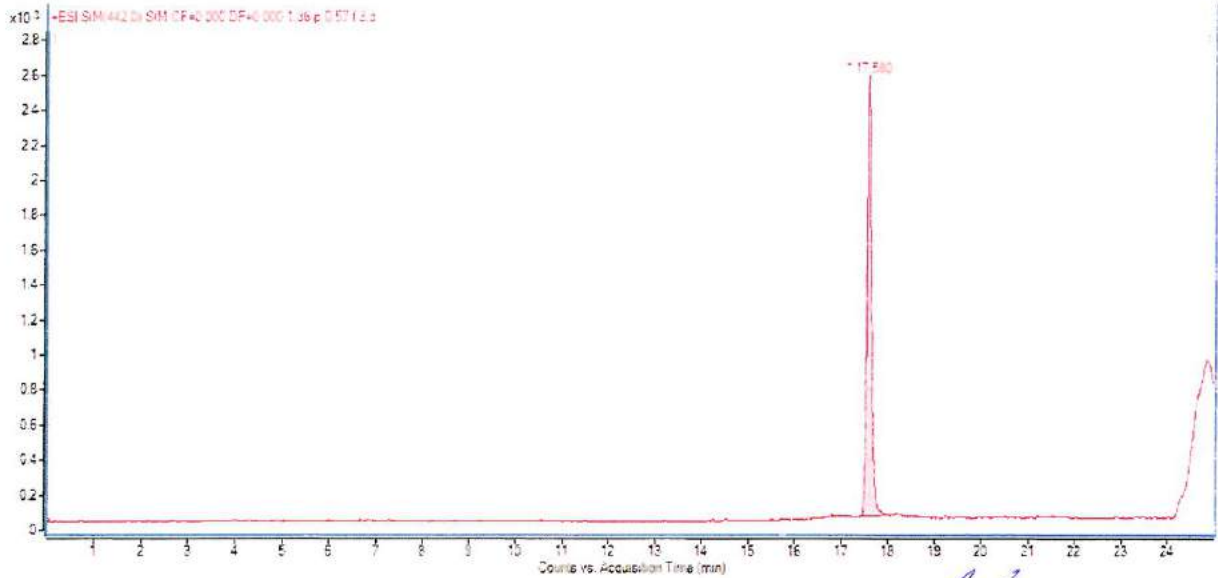
Пиридоксин концентрация 1.04 мг/л



Рибофлавин 0.08 мг/л



Фолиевая кислота 0.57 мг/л

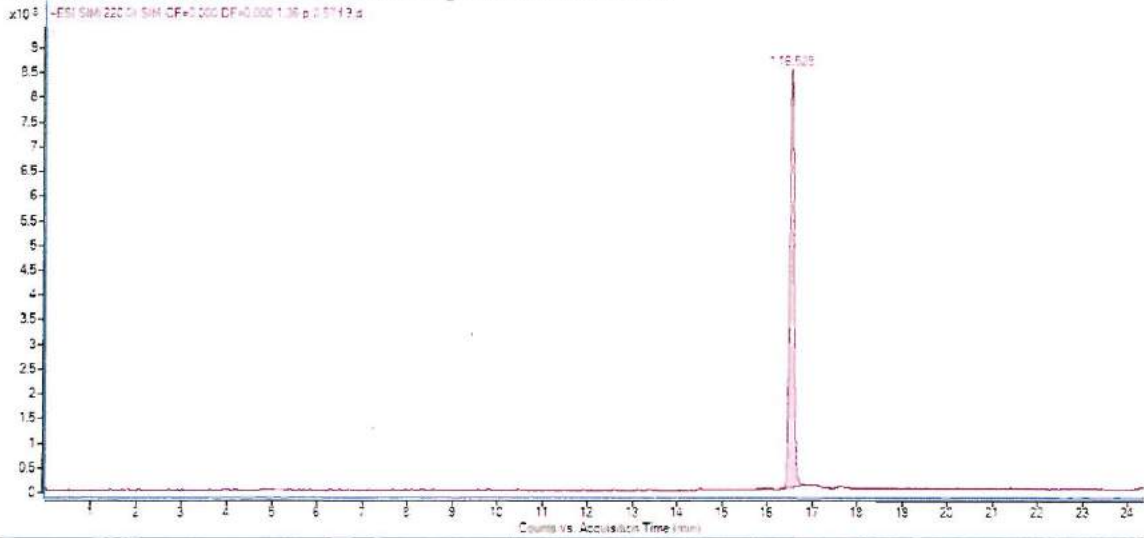


Специалист:

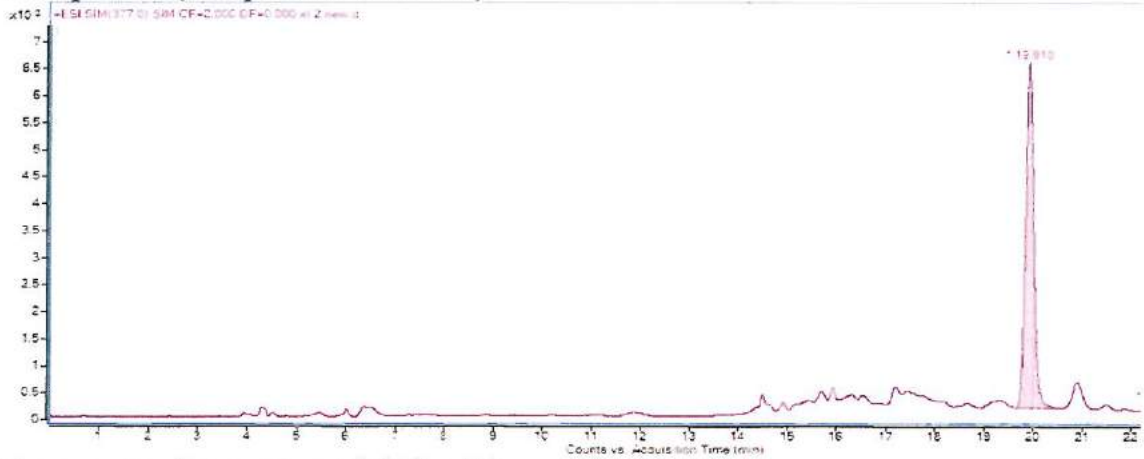
С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 32

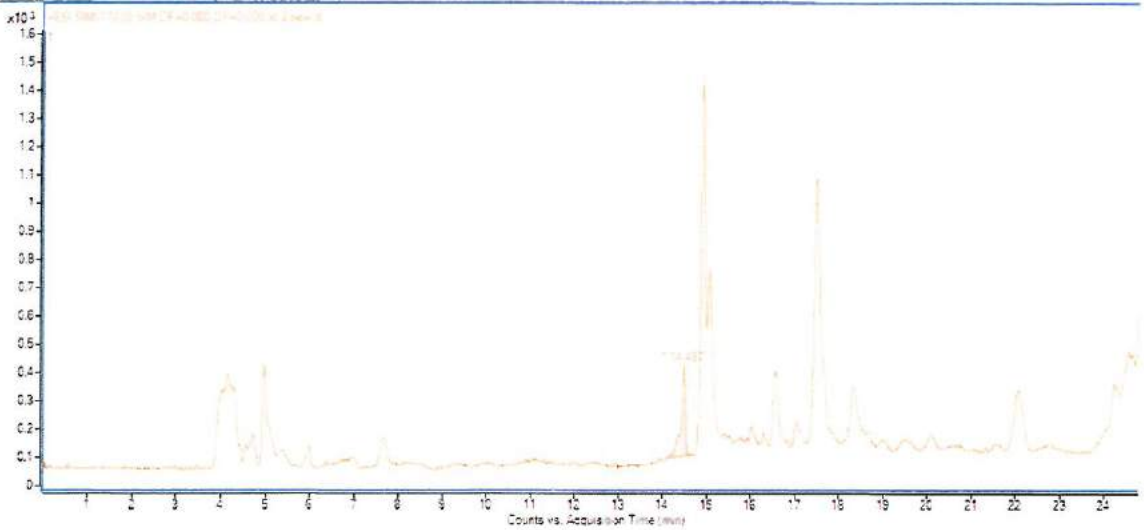
Пантотеновая кислота с концентрацией 1.36 мг/л



Образец исследования:
Рибофлавин (содержание 0.37 мг/л)



Пиридоксин (содержание 0.018 мг/л)

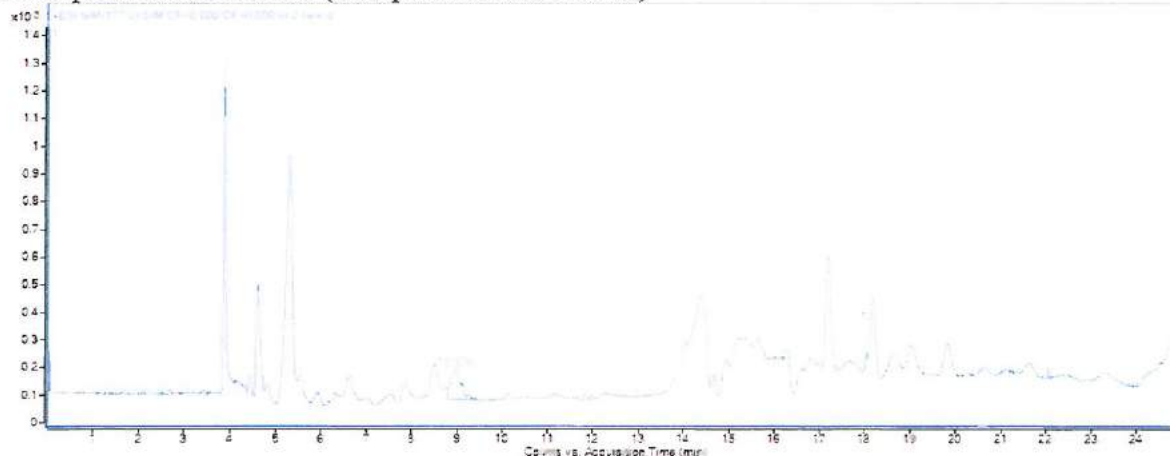


Специалист:

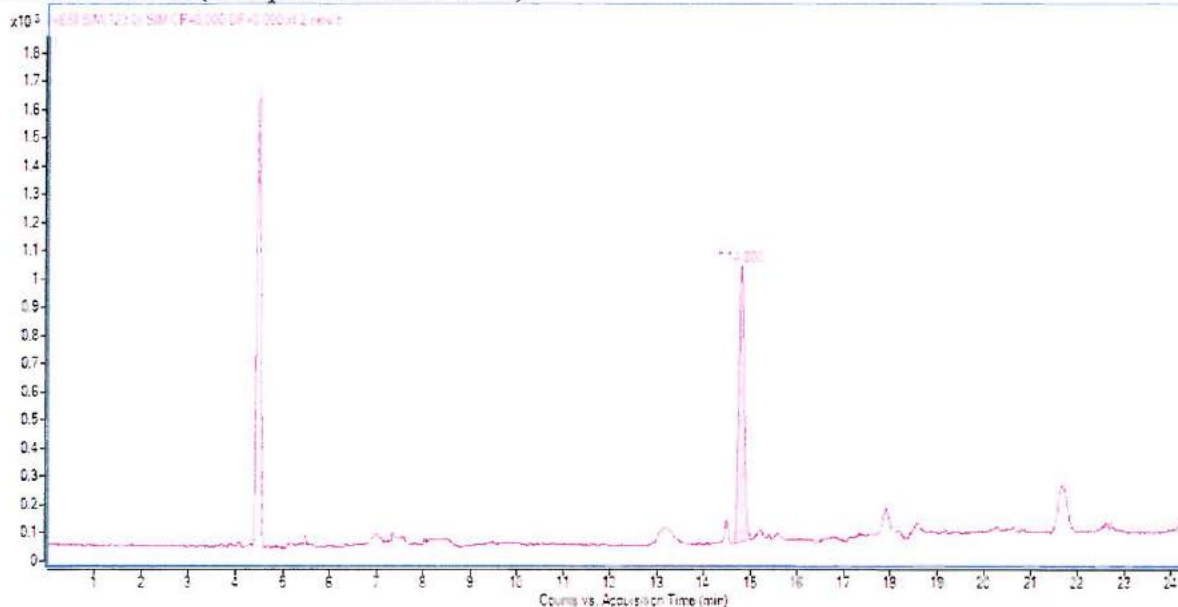
С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 33

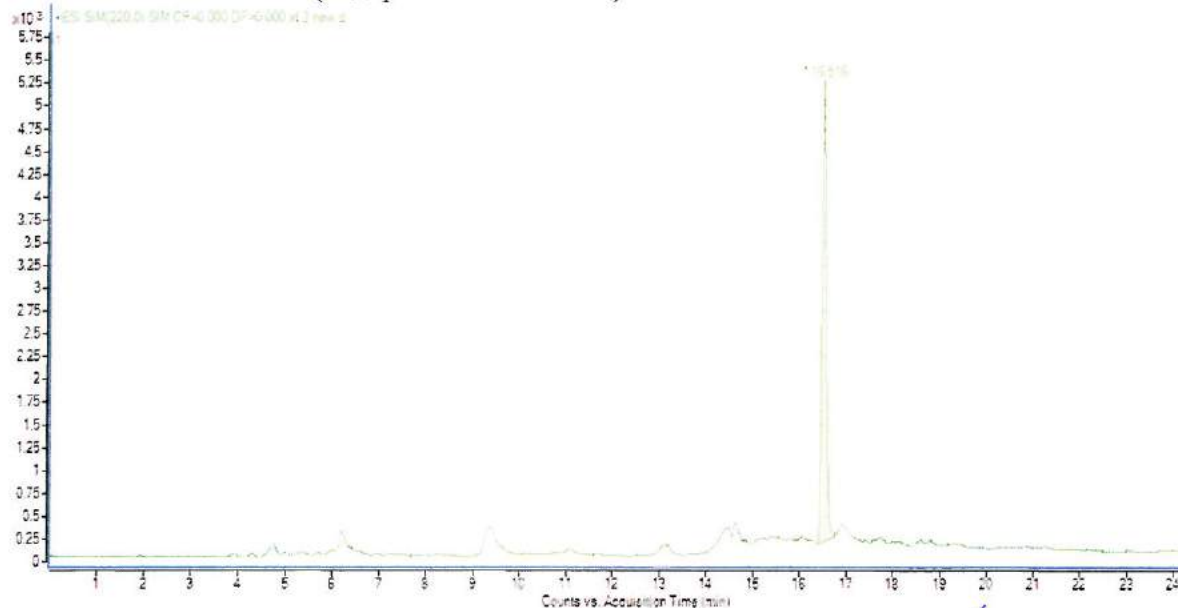
Аскорбиновая кислота (содержание 0.122 мг/л)



Никотинамид (содержание 0.073 мг/л)



Пантотеновая кислота (содержание 0.83 мг/л)

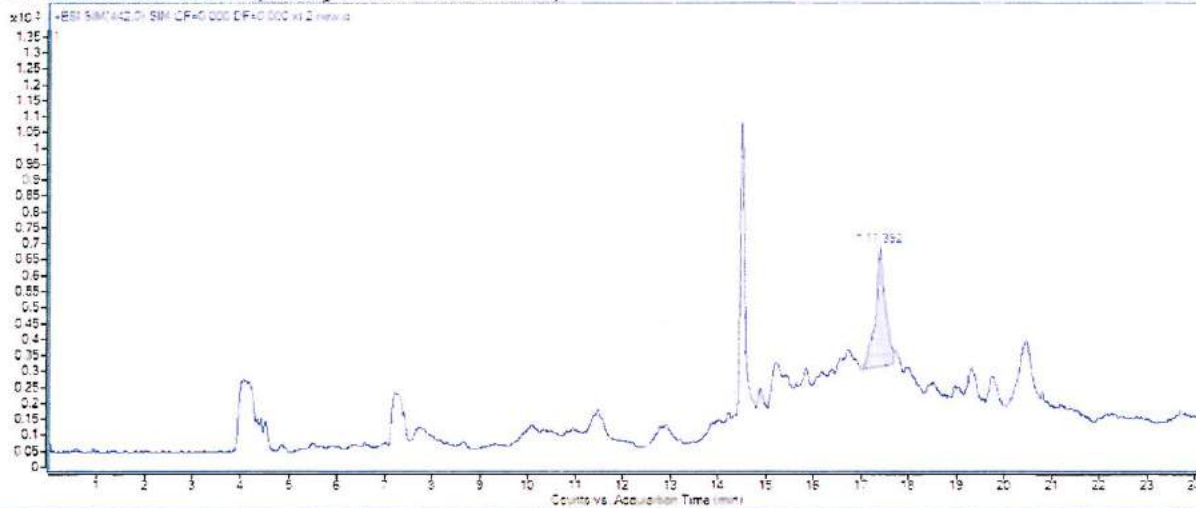


Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 34

Фолиевая кислота (содержание 0.18 мг/л)

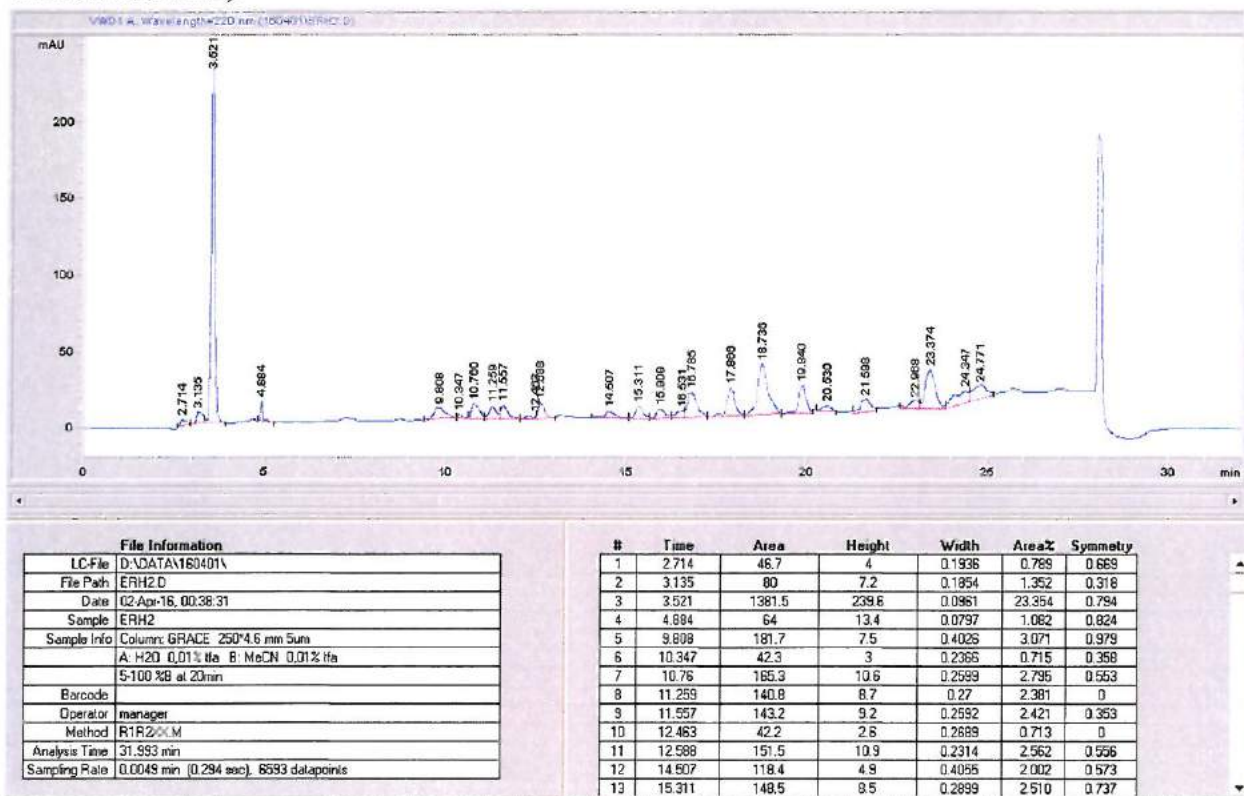


Специалист:

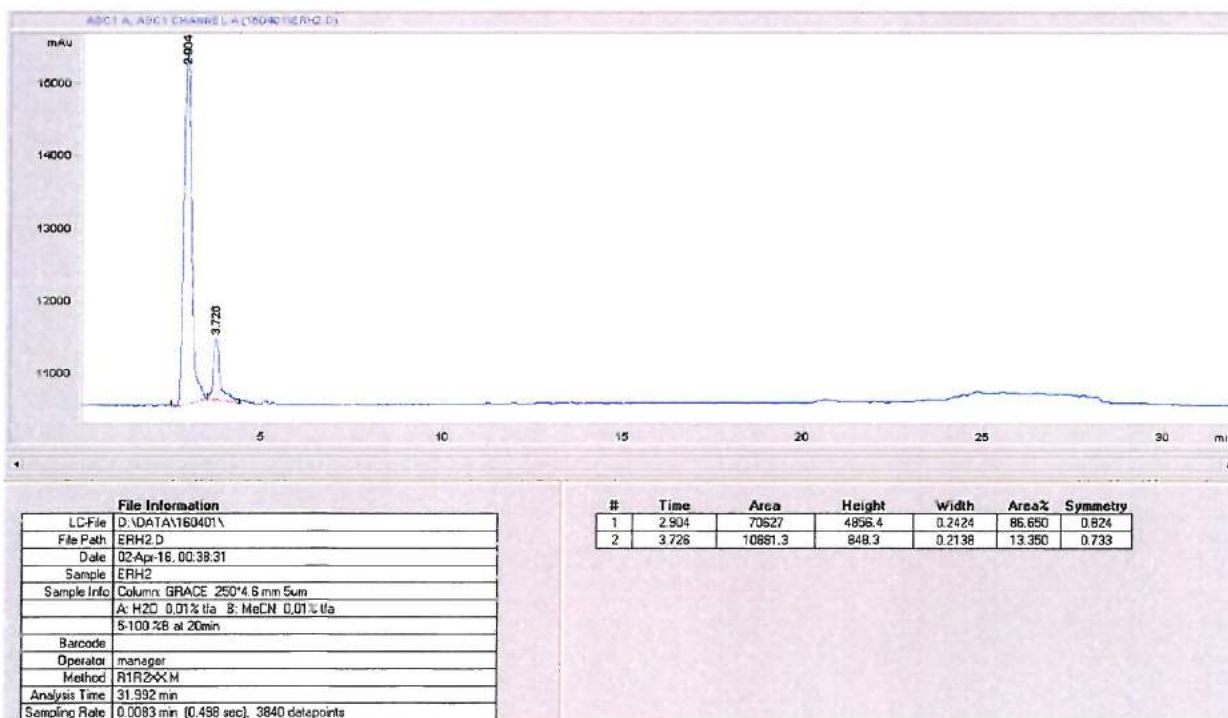
С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 35

Приложение 6. Хроматограммы и масс-спектры образца (идентификация антиоксидантов).



Хроматограмма с УФ детектором.

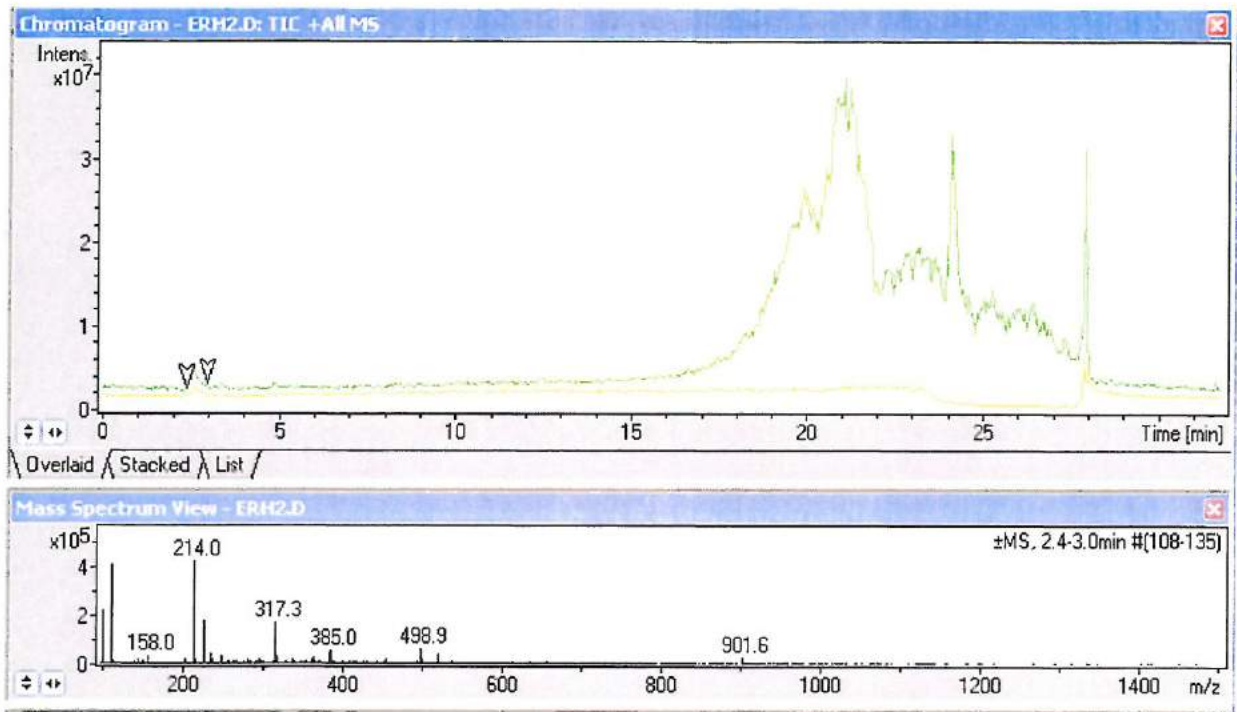


Хроматограмма с ELSD детектором.

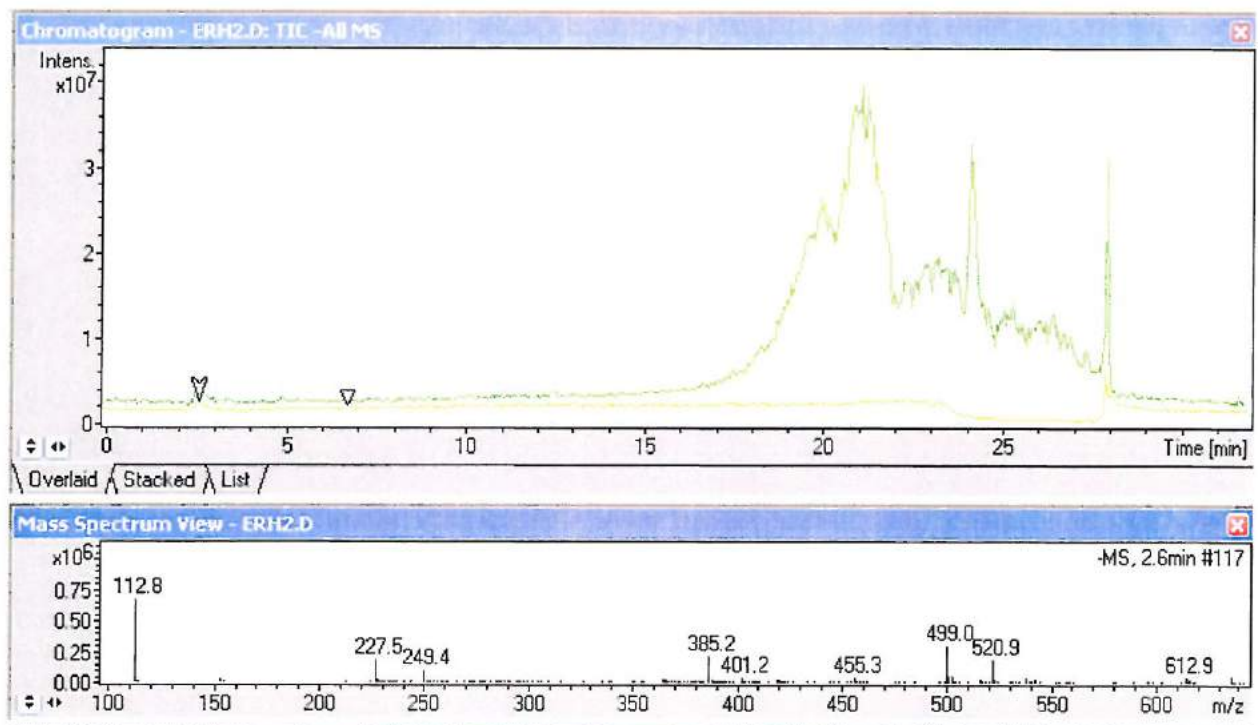
Специалист:

С. В. Топилин
 Центр химических исследований
 ООО «ЦХИ»

Стр. 36



Масспектр (положительный) пика с временем удерживания 2,7 мин.

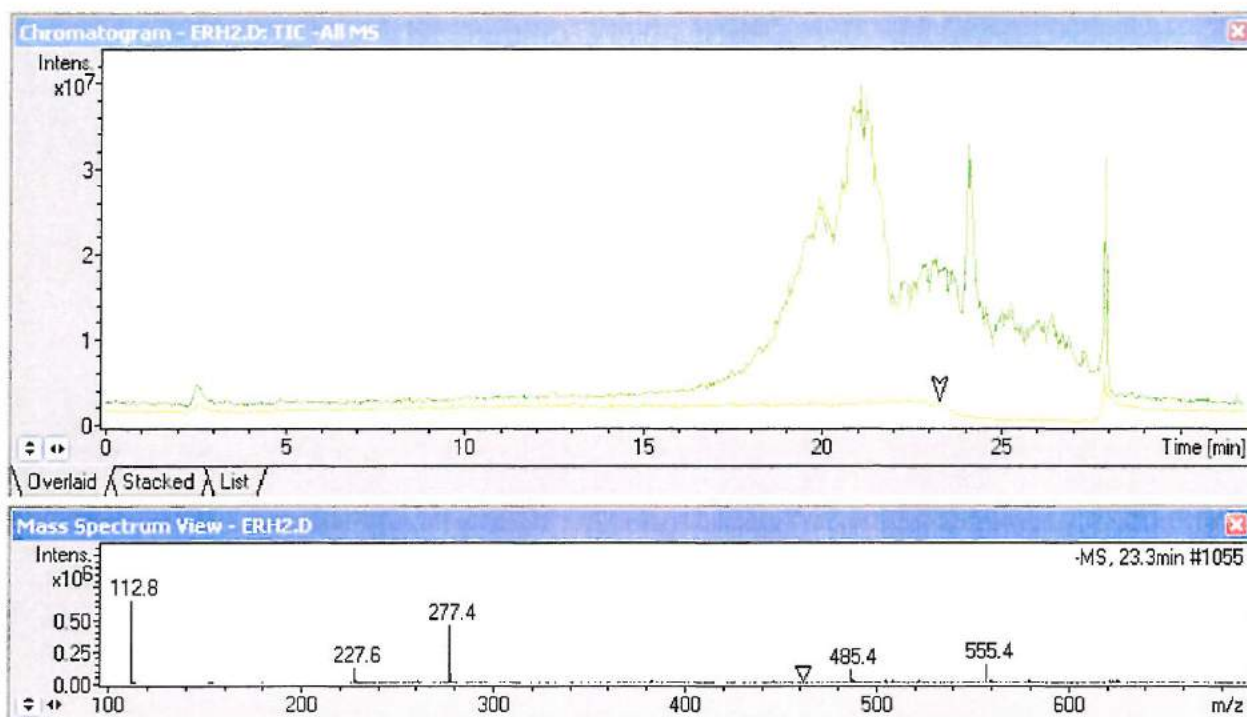


Масспектр (отрицательный) пика с временем удерживания 2,7 мин.

Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 37



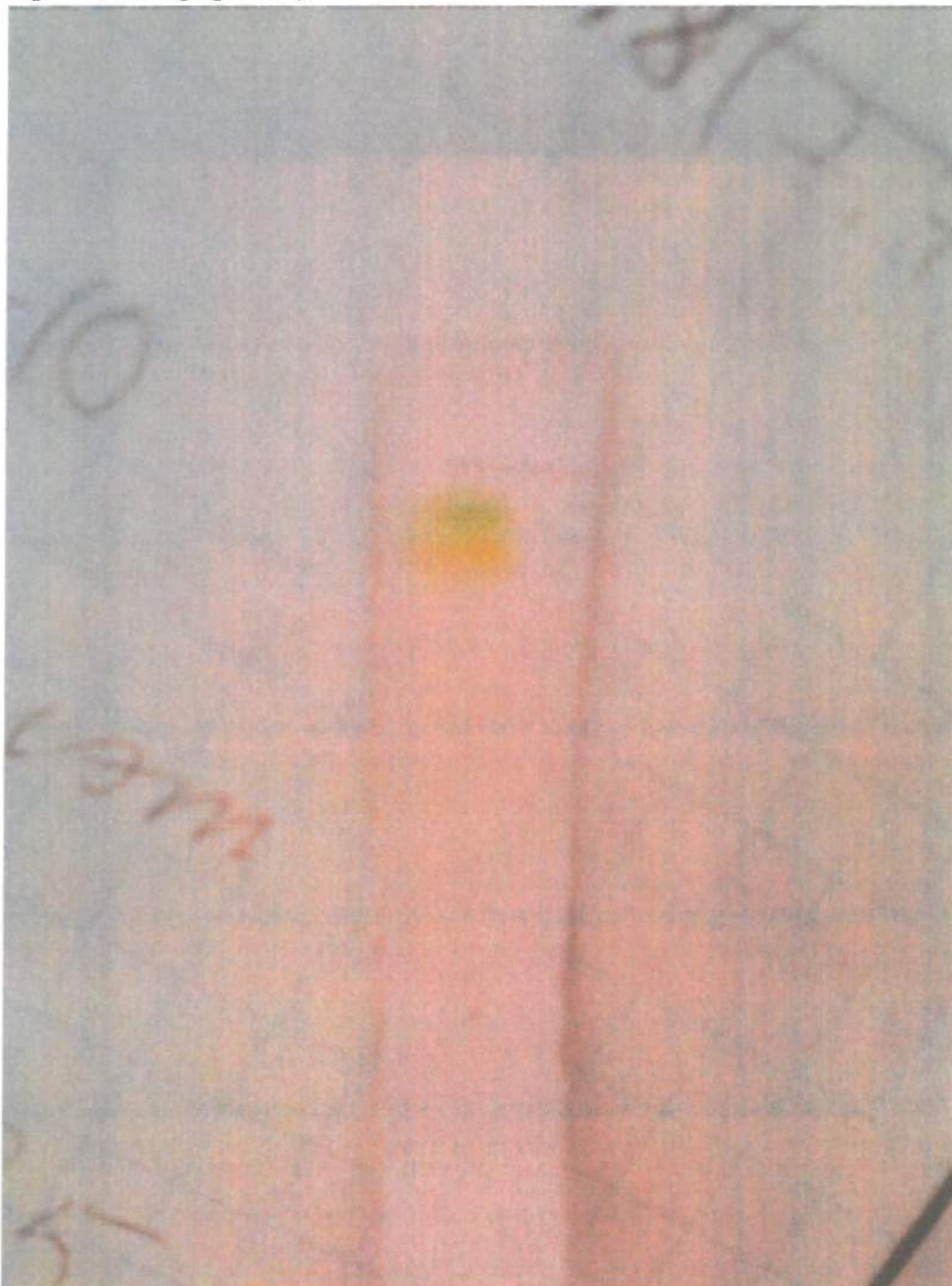
Масспектр (отрицательный) пика с временем удерживания 23,3 мин.

Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 38

Приложение 7. Хроматограмма, полученная методом тонкослойной хроматографии (идентификация хлорофиллов).

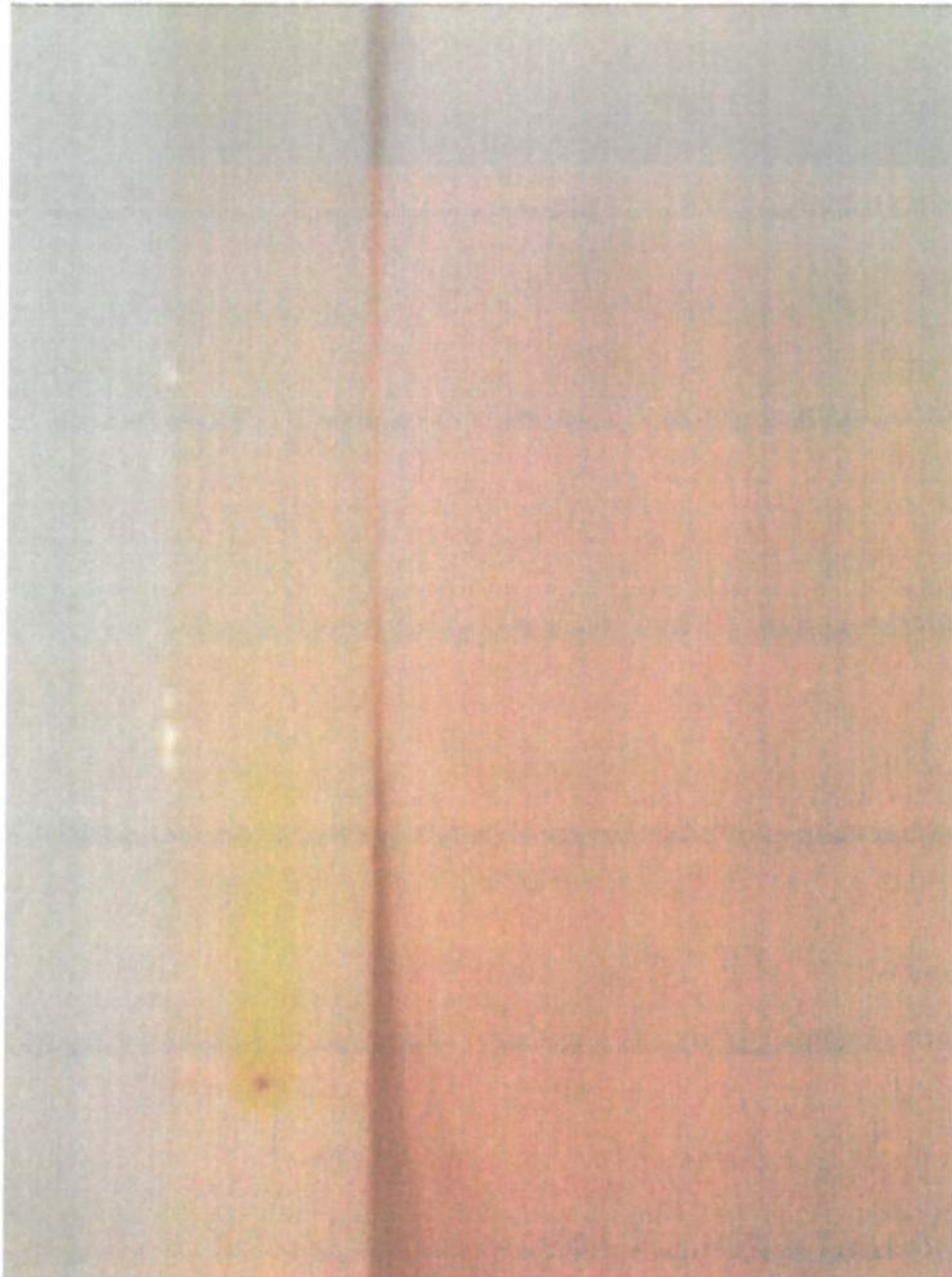


Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 39

Приложение 8. Хроматограмма, полученная методом тонкослойной хроматографии (идентификация каротиноидов).



Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 40

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping, fluid strokes, positioned over the printed name and affiliation of the specialist.

Приложение 9. Копии документов, подтверждающих компетенцию специалиста.



Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 41

некоммерческое партнерство
"ПАЛАТА СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТОВ"

Москва

26 декабря 2012 г.

СВИДЕТЕЛЬСТВО

*Топилин Сергей
Васильевич*

прошел (прошла) обучение по программе
повышения квалификации судебных экспертов
в объеме 104 учебных часов:

«Основы судебной экспертизы»

утвержденной Приказом Минюста России от 06 июля 2004 г., № 123.



Генеральный директор
НП «СУДЭК»

 С.Е.Киселев

Федеральный закон
«О государственной судебно-экспертной деятельности в Российской Федерации»
(№73-ФЗ от 31.05.2001).

Статья 41. Распространение действия настоящего Федерального закона на судебно-экспертную деятельность лиц
не являющихся государственными судебными экспертами

В соответствии с нормами процессуального законодательства Российской Федерации судебная экспертиза может
производиться вне государственных судебно-экспертных учреждений лицами, обладающими специальными знания-
ми в области науки, техники, искусства или ремесла, но не являющимися государственными судебными экспертами.

**СИСТЕМА ДОБРОВОЛЬНОЙ СЕРТИФИКАЦИИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СУДЕБНЫХ
ЭКСПЕРТОВ И СУДЕБНО-ЭКСПЕРТНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ
ПРОИЗВОДСТВО СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ**

Зарегистрирована в Едином реестре зарегистрированных систем добровольной
сертификации Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии
Российской Федерации

Регистрационный № РОСС RU.И998.04ЖЗБ0 от 11.12.2012г.



Орган по сертификации:

Некоммерческое партнерство
"Сибирская Гильдия Судебных Экспертов"

СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ

№ 177550147

Действителен с «15» октября 2015г. по «14» октября 2018 г.

Настоящий сертификат удостоверяет, что:

Топилин Сергей Васильевич

*является компетентным и соответствует требованиям Системы добровольной
сертификации деятельности судебных экспертов и судебно-экспертных организаций,
осуществляющих производство судебных экспертиз в области:*

**«Применение хроматографических методов при исследовании
объектов судебной экспертизы»**

Основание для выдачи сертификата:

Решение экспертной комиссии № 104
от 15 октября 2015г.



Руководитель органа _____

А.Н. Дударев

Приложение 4. Сертификаты соответствия экспертного учреждения.

INTERNATIONAL QUALITY STANDART



Система добровольной сертификации
«МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА»
(СИСТЕМА «МСК»)

Зарегистрирована в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии
Регистрационный номер в едином реестре зарегистрированных
Систем добровольной сертификации
РОСС RU.3707.04ЮАЕ0

Орган по сертификации «Современные Стандарты Качества»
115533 г. Москва, проспект Андропова д.22, тел.: 8-800-250-92-90; +7(499)951-01-90

СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ

№ RU.MSK.009.005.CM.0516

Срок действия с 31 августа 2015 г. по 30 августа 2018 г.

Выдан: Обществу с ограниченной ответственностью
«Центр химических исследований»
107143, г. Москва, ул. Вербная, д.8, стр. 5, офис 207
ОГРН: 1137746231314, ИНН: 7705535640

Настоящий сертификат удостоверяет, что
Система менеджмента качества при осуществлении видов работ,
указанных в приложении к настоящему сертификату соответствия

соответствует требованиям:
ГОСТ ISO 9001-2011 (ISO 9001:2008, IDT) «Система менеджмента качества. Требования»

Основания для выдачи:
Решение экспертной комиссии ОС «Современные Стандарты Качества» № 314 от 31.08.2015 г.

Действие сертификата соответствия не имеет территориальных ограничений

Руководитель органа
по сертификации

Ю.А. Прохоров

Эксперт

В.С. Цой

Зарегистрирован в Реестре Системы «Международный стандарт качества» 31 августа 2015 г.

Подтверждение действия сертификата соответствия:

30.08.2016г.

30.08.2017г.

м.п.

м.п.

Сертификат соответствия без подтверждения его действия недействителен.

№425100

Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 44

INTERNATIONAL QUALITY STANDART

МЕЖДУНАРОДНЫЙ
СТАНДАРТ
КАЧЕСТВА



INTERNATIONAL
QUALITY
STANDART

Система добровольной сертификации
«МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА»
(СИСТЕМА «МСК»)

Зарегистрирована в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии
Регистрационный номер в едином реестре зарегистрированных
Систем добровольной сертификации
РОСС RU.3707.04ЮАЕ0

Орган по сертификации «Современные Стандарты Качества»
115533 г. Москва, проспект Андропова д.22, тел.: 8-800-250-92-90; +7(499)951-01-90

ПРИЛОЖЕНИЕ К СЕРТИФИКАТУ СООТВЕТСТВИЯ

№ RU.MSK.009.005.CM.0516

Страница №1

Виды работ:

1. Работы в области проведения испытаний:
 - 1.1. Пищевых продуктов.
 - 1.2. Воды питьевой технической сточной и лобочных продуктов водного хозяйства.
 - 1.3. Лекарственных средств.
 - 1.4. Биологически-активных добавок к пище и спортивного питания.
 - 1.5. Парфюмерно-косметической продукции.
 - 1.6. Нефти и нефтепродуктов.
 - 1.7. Угля, торфа, топлива.
 - 1.8. Металлов сплавов и металлических изделий.
 - 1.9. Продукции неорганической и органической химии.
 - 1.10. Полимеров пластических масс и изделий из резины и пластмассы.
 - 1.11. Минеральных удобрений.
 - 1.12. Лакокрасочной продукции.
 - 1.13. Бытовой химии.
 - 1.14. Объектов окружающей среды: вода, воздух, почва, отходы.
2. Работы в области проведения судебных экспертиз:
 - 2.1. С применением методов молекулярной спектроскопии.
 - 2.2. С применением методов атомной спектроскопии.
 - 2.3. С применением рентгенографических методов.
 - 2.4. С применением рентгеноспектральных методов и методов электронной микроскопии.
 - 2.5. С применением хроматографических методов.
3. Проведение научных исследований:
 - 3.1. В области аналитической и физической химии.
 - 3.2. В области органического синтеза.
4. Работы в области разработок метадок и рецептур.

Руководитель органа
по сертификации

Ю.А. Прохоров



Эксперт

В.С. Цой

Приложение без сертификата соответствия недействительно.

№425101

Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 45



Специалист:

С. В. Топилин
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 46

Пролито, пронумеровано и
скреплено печатью

Листафов

С.В. Топилин

