

УДК 543.544.547.979.7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С КОСВЕННЫМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

В. И. Анышаков, И. С. Алпеева, Г. Д. Брыкина, Е. Е. Лазарева

(кафедра аналитической химии)

Изучено поведение витаминов Е и D₃ на колонках Диасорб-130-NH₂, Силасорб-600, Нуклеосил С₁₈ с использованием немодифицированных и модифицированных подвижных фаз. В качестве модификаторов подвижных фаз исследованы хлорофилл и тетрафенилпорфирин. Найдены условия разделения витаминов Е и D₃, а также косвенного спектрофотометрического детектирования витамина Е. Показано, что предел обнаружения витамина Е методом ВЭЖХ на колонке с Нуклеосилом С₁₈ в ацетонитриле, модифицированном тетрафенилпорфирином, ниже, чем известный из литературы (прямое УФ-детектирование). Проанализированы фармацевтические препараты, содержащие витамин Е.

Для разделения и определения витаминов широко используется нормально- и обращенно-фазовый варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Известно также, что предел обнаружения УФ-детектором α-токоферола, обладающего наибольшей биологической активностью, выше, чем предел обнаружения других жирорастворимых витаминов [1]. Цель настоящей работы – идентификация и количественное определение витаминов Е и D₃ методом ВЭЖХ с косвенным спектрофотометрическим детектированием. В качестве модификаторов подвижных фаз исследованы хлорофилл (Хл) и тетрафенилпорфирин (Н₂ТФП). При выборе модификаторов учитывали, что витамин Е относится к природным фенолам [2], а принципиальная возможность использования хлорофилла, обладающего ε > 1·10⁵ л/моль·см, λ = 404 нм, для косвенного детектирования фенолов в ВЭЖХ была показана ранее [3].

Экспериментальная часть

В качестве подвижных фаз использовали растворители: ацетонитрил (АН), гексан, диоксан, этилацетат (ЭА), изопропанол (ИП), метанол, хлороформ, циклогексанол, воду

или их смеси. Для косвенного детектирования витаминов эти подвижные фазы модифицировали растворами хлорофилла в этаноле (1,33·10⁻⁵М, 8,89·10⁻⁶М, 4,45·10⁻⁶М) и тетрафенилпорфирина в этилацетате (8,33·10⁻⁶М). Равновесие в колонках устанавливали после пропускания 2000 мкл модифицированной подвижной фазы.

Хлорофилл (a+b) экстрагировали из листьев сухой крапивы по стандартной методике. Концентрацию полученного раствора определяли спектрофотометрически. Известную аликвоту раствора переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки подвижной фазой (ПФ).

Точную навеску тетрафенилпорфирина фирмы «Fluka» растворяли в известном объеме этилацетата. Далее переносили аликвоту раствора в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки ПФ. Точные навески продажных препаратов витаминов Е и D₃ растворяли в изопропанол, этаноле или ПФ. Для построения градуировочных графиков растворы витаминов исходных концентраций последовательно разбавляли.

Хроматографическое поведение витаминов исследовали на микроколоночном жидкостном хроматографе Милхром 4 с колонками из нержавеющей стали 64×3 мм,

Т а б л и ц а 1

Коэффициенты емкости витаминов на разных колонках

Витамин	Диасорб-130-NH ₂ (280) нм				Силасорб-600 (280) нм				Нуклеосил-С ₁₈ (280) нм		Нуклеосил-С ₁₈ (404) нм	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Е	0,77	0,87	1,20	0,79	0,71	0,67	0,72	1,32	4,85	4,04	3,29	4,29
D ₃	1,20	0,85	Размыв.	1,05	0,77	2,21	1,80	9,73	0,37	4,21	5,55	–

Примечания. 1 – гексан – ИП (95:5); 2 – АН – Н₂O (75:25); 3 – СН₃ОН – Н₂O (4:1); 4 – гексан – ИП (95:5); 5 – СН₃Сl – гексанол (95:5); 6 – гексан – ЭА (5:1); 7 – гексан – диоксан – ИП (94,5:5:0,5); 8 – гексан – диоксан (97:3); 9 – АН; 10 – АН – СН₃ОН (70:30); 11 – АН+ТФП (8·10⁻⁶ М); 12 – АН+Хл (4,45·10⁻⁶ М).

Содержание витамина Е в определяемых объектах ($n = 3, P = 0,95$)

Объект исследования	Подвижная фаза				Содержание по паспорту
	АН + хлорофилл ($c = 8,89 \cdot 10^{-6} \text{ М}$)		АН+Н ₂ ТФП ($c = 8,33 \cdot 10^{-6}$)		
	$\langle N_{\text{пика}} \rangle$, мм	$\langle m(\text{Е}) \rangle$, г	$\langle S_{\text{пика}} \rangle$, мм ²	$\langle m(\text{Е}) \rangle$, г	
Компливит	2,33	0,011±0,001	11	0,0101±0,0006	0,01
Масло	7,00	0,0715±0,0084	40	0,0782±0,0008	0,08534

64×2 мм и 80×2 мм, заполненных сорбентами Силасорб 600 (5 мкм), Нуклеосил С₁₈ (5 мкм) и Диасорб-130-NH₂ (7 мкм) соответственно; объем пробы составлял 2–15 мкл; расход подвижной фазы – 100 или 50 мкл/мин.

Прямое детектирование витаминов проводили при $\lambda = 280$ нм, косвенное – при $\lambda = 404$ нм. Электронные спектры поглощения (ЭСП) подвижных фаз снимали на спектрофотометре «Hewlett Packard 8452 А», $l = 1$ см.

Мертвый объем V_m определяли по удерживанию несорбируемых компонентов: ССl₄ для колонок Силасорб 600 (112 мкл) и Диасорб-130-NH₂ (123 мкл), и нитрометана для колонки Нуклеосил С₁₈ (119 мкл).

Хроматографическое поведение витаминов оценивали с помощью коэффициентов емкости $k' = (V_R - V_m)/V_m$.

Результаты и их обсуждение

Прямое детектирование (280 нм). На колонке Диасорб-130-NH₂ коэффициенты емкости витаминов низки, различаются незначительно, кроме того витамины в ряде случаев выходят из колонки вместе с растворителем (табл. 1). На этой колонке поведение витаминов в модифицированных ПФ не изучали. На колонке Силасорб 600 во всех элюентах коэффициент емкости витамина D₃ больше, чем k' Е, что согласуется с их гидрофобностью. Лучшего разделения удалось добиться в ПФ гексан–диоксан (97:3) (рис. 1). Однако при прямом спектрофото-

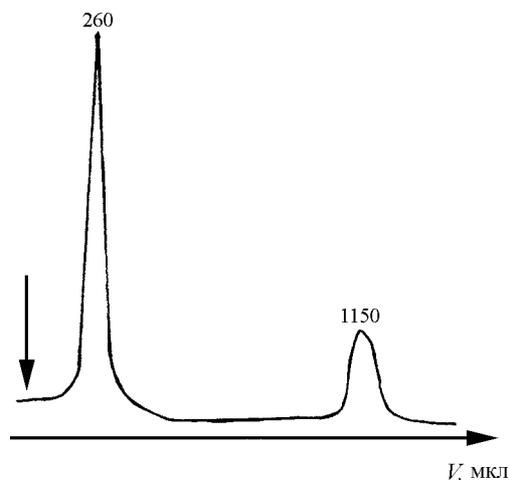


Рис. 1. Хроматограмма смеси витаминов Е (260 мкл) и D₃ (1150 мкл). Колонка Силасорб 600, ПФ гексан – диоксан (97:3), $F = 100$ мкл/мин

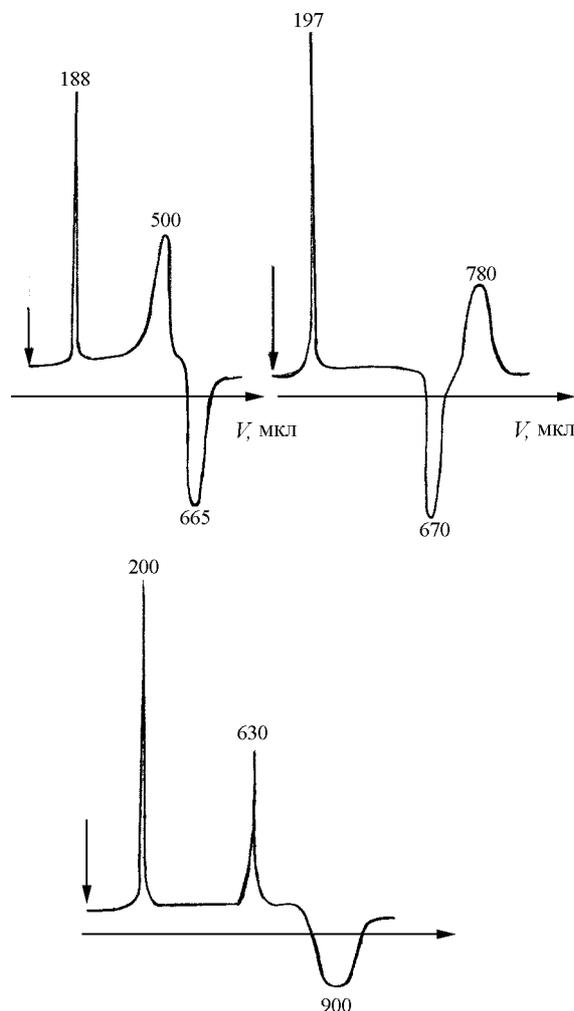


Рис. 2. Хроматограммы витаминов на колонке Нуклеосил С₁₈ (404 нм) а – 5 мкл витамина Е в ИП, б – 7 мкл витамина D₃ в этаноле; ПФ АН+Н₂ТФП ($C = 8,33 \cdot 10^{-6} \text{ М}$); в – 10 мкл витамина Е в ИП; ПФ АН+хлорофилл ($C = 4,55 \cdot 10^{-6} \text{ М}$)

метрическом детектировании определение в этих условиях витамина Е в фармацевтическом препарате «Компливит» оказалось невозможным из-за перекрытия пика витамина Е пиком ретинола, также входящим в состав исследуемого препарата. На колонке Нуклеосил С₁₈ (табл. 1) в АН порядок выхода витаминов Е и D₃ закономерно изменяется на обратный по сравнению с показанным на рис. 1. В ПФ АН – метанол (70:30) k' витаминов различаются незначительно.

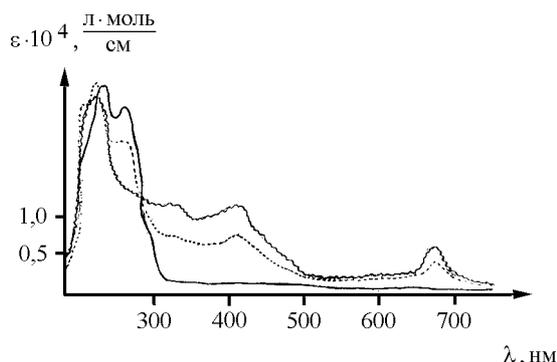


Рис. 3. ЭСП хлорофилла (1), витамина D₃ (2), хлорофилл – витамин D₃ (5,1:1) (3)

Косвенное детектирование (404 нм). Для косвенного спектрофотометрического детектирования витаминов E и D₃ две ПФ (АН и гексан – диоксан) модифицировали хлорофиллом и тетрафенилпорфирином. Хроматографические системы при этом приобретают новые свойства. В модифицированной ацетонитрильной фазе удерживание витаминов E и D₃ сильно изменяется по сравнению с их удерживанием в АН (табл.1). Значительно увеличивается удерживание витамина D₃ и незначительно уменьшается удерживание витамина E. При введении пробы (растворитель, модификатор, витамин) в колонку с модифицированной ПФ происходит нарушение равновесного распределения модификатора между подвижной и неподвижной фазами, на хроматограмме появляются пики модификатора, растворителей и витаминов, соответствующие этим нарушениям. Объемы удерживания растворителей (188–200 мкл), отрицательных системных пиков Хл (900 мкл) и H₂ТФП (665–670 мкл), витаминов E (500, 630 мкл) и D₃ (780 мкл) на колонке Нуклеосил C₁₈ указаны на хроматограммах (рис. 2). Меньший объем удерживания H₂ТФП по сравнению с объемом удерживания хлорофилла связан с большей гидрофобностью последнего. Это приводит к тому, что витамин E выходит до системного пика, витамин D₃ – после системного пика. Направление пиков E и D₃ положительное. Такие изменения связаны, по-видимому, с различной степенью взаимодействия витаминов, различающихся гидрофобностью, с модификатором – хлорофиллом. Электронное строение порфиринов позволяет оценить слабые взаимодействия молекул модификаторов и сорбатов спектрофотометрическим методом. Ниже рассмотрены, например, изменения в ЭСП хлорофилла в присутствии витамина D₃ (рис. 3). При соотношении витамина D₃ и хлорофилла (5,1:1) наблюдается bathochromic сдвиг на 4 нм плеча в спектре хлорофилла при длине волны 228 нм. И на фоне общего гипохромного эффекта наблюдается гиперхромный эффект в области 265–285 нм. На состояние π-системы хлорофилла, возможно, влияют взаимодействия гидрофобных структур – фитолового остатка хлорофилла и витаминов.

При введении пробы с одинаковым содержанием витамина E в подвижные фазы с различным содержанием хлорофилла обнаружили, что высота (площадь) пика вита-

мина E возрастает с увеличением концентрации модификатора ПФ (рис. 4). Ниже приведены уравнения градуировочных графиков для определения витамина E в препаратах «Компливит» и «Витамин E в масле для внутримышечных инъекций 10%-й раствор»:

$$H = 237792 \cdot m - 0,6245 (c_{\text{ХЛ}} = 8,89 \cdot 10^{-6} \text{ М}),$$

$$S = 10^6 \cdot m + 0,6148 (c_{\text{ТФП}} = 8,33 \cdot 10^{-6} \text{ М}),$$

где H – высота пика (мм), S – площадь пика (мм²), m – масса витамина E (г).

Витамин E из поливитаминного препарата «Компливит» экстрагировали по следующей методике: таблетку препарата растирали в ступке, брали точную навеску (0,9773 г), переносили в мерную пробирку и экстрагировали 10 мл ИП, полученный светло-желтый раствор отфильтровывали и использовали для определения витамина E. Из точной навески (0,8534 г) фармацевтического препарата «Витамин E в масле для внутримышечных инъекций 10%-й раствор» α-токоферил ацетат экстрагировали 2 мл этанола. Слои растворителей разделяли при помощи делительной воронки. Верхний слой (раствор витамина E в этаноле) использовали для анализа.

Результаты определения содержания витамина E в объектах приведены в табл. 2. Предел обнаружения витамина E методом ВЭЖХ на колонке Нуклеосил C₁₈ в ПФ АН+H₂ТФП ($c_{\text{ТФП}} = 8,33 \cdot 10^{-6} \text{ М}$) при косвенном спектрофотометрическом детектировании составил 0,3 мкг, т.е. на порядок ниже, чем известный из литературы (прямое УФ детектирование) [4].

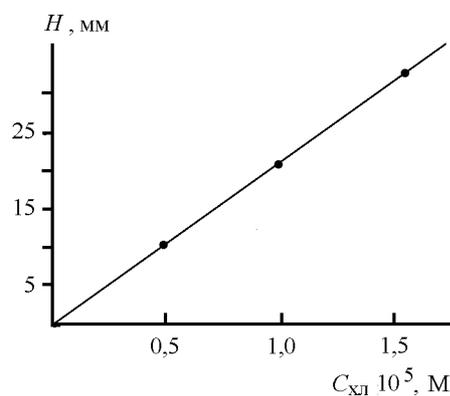


Рис. 4. Зависимость аналитического сигнала от концентрации модификатора в ПФ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВЭЖХ в биохимии / Под ред. А. Хеншена и др. М., 1988. С. 591.
2. Хроматография. Практическое приложение метода. Т. 1 / Под ред. Э. Хефтмана. М., 1986. С. 248.
3. Брыкина Г.Д., Лазарева Е.Е., Уварова М.И., Шпигун О.А. // ЖАХ. 1997. 52. С. 1073.
4. Papadaoyannis I.N., Tsioni G.K., Samanidou V.F. // J. Liq. Chromatogr. and Relat. Technol. 1996. 20. P. 2003.

Поступила в редакцию 01.07.99