

УДК 547.979.733:543.867:543.544

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СОРБЕНТАХ

В.С. Мочалова, Г.Д. Брыкина, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии; e-mail: vera_mochalova@mail.ru)

Изучены хроматографические свойства НЕМА S 1000 QL, модифицированного окта-4,5-карбоксихлороцианатом цинка и 3,8-ди(1-метоксиэтил)дейтеропорфирином IX. В качестве сорбатов исследована модельная смесь водорастворимых витаминов. Спектрофотометрически подтверждено наличие слабых взаимодействий между молекулами модификаторов и витаминов. Найдены условия разделения витаминов. В оптимальных условиях разделения проанализированы фармацевтические препараты.

Актуальной проблемой является изучение свойств, полученных простыми методами новых адсорбентов на основе известных матриц для ВЭЖХ [1, 2], а также определение витаминов в поливитаминных препаратах и премиксах [3]. Работа посвящена исследованию хроматографических свойств НЕМА S 1000 QL, модифицированного окта-4,5-карбоксихлороцианатом цинка ($ZnPC(COOH)_8$) и 3,8-ди(1-метоксиэтил)дейтеропорфирином IX (H_2DP). Выбор модификаторов обусловлен тем, что сорбенты на основе порфиринов и их аналогов обеспечивают уникальные разделения в вариантах нормальных и обращенных фазах и анионного обмена [4]. В качестве сорбатов выбраны модельные смеси водорастворимых витаминов: цианокобаламин (B_{12}), тиамин гидрохлорид (B_1), никотинамид (НА), пиридоксин гидрохлорид (B_6), аскорбиновая кислота (С), никотиновая кислота (НК), рибофлавин (B_2), фолиевая кислота (B_9).

Экспериментальная часть

Окта-4,5-карбоксихлороцианат цинка синтезирован и очищен в ИГТХУ (г. Иваново), 3,8-ди(1-метоксиэтил)дейтеропорфирин IX – на кафедре биохимии МГАТХТ (г. Москва). Стандартные растворы модификаторов ($1,25 \times 10^{-4} M$) и водорастворимых витаминов ($n \times 10^{-4} M$) готовили растворением точных навесок реагентов в дистиллированной воде. Витамины B_9 и B_2 подщелачивали 1 М NaOH до pH 8–9.

В работе использовали ионообменник низкой емкости на основе полиметакрилата НЕМА S 1000 QL, (“Tessek”, Чехия). Сорбент модифицировали в статических условиях (навеска сорбента 1 г, объем раствора модификатора 50 мл, концентрация $1,25 \times 10^{-5} M$ и $2,5 \times 10^{-5} M$; время контакта фаз 1ч).

Сорбент отделяли от раствора, высушивали на воздухе и использовали для заполнения колонки суспензионным способом под давлением 100–150 бар при помощи насоса “KNAUER” (Германия). Содержание модификатора на поверхности сорбента составило: 0,65 мкмоль/г H_2DP (колонка 1); 1,3 мкмоль/г H_2DP (колонка 2); 0,65 мкмоль/г $ZnPC(COOH)_8$ (колонка 3). При промывании колонки, заполненной модифицированными сорбентами, 0,1 М хлоридом натрия, ацетонитрилом (АН) и буферными растворами, модификатор не десорбировался.

ЭСП измеряли на спектрофотометре “Shimadzu 2201”. Хроматографическая система состояла из насоса (“Mарафон”, Россия), спектрофотометрического детектора (“Biotronik BT-8200”, Германия), стальной колонки 100×4 мм, упакованной вышеперечисленными сорбентами. Объем пробы 20 мкл, длина волны детектирования 254 нм, чувствительность 0,04, мертвое время 60 с. В качестве подвижных фаз использовали АН, воду, фосфатный буфер (pH 6,86); боратный буфер (pH 9,18), а также эти буферные растворы, содержащие до 8% АН.

В качестве конкретных объектов использовали поливитаминные препараты “Пентовит” (“Алтайвитамины” г. Бийск) и “Фенюльс” (“Ранбакси”, Индия). Пробоподготовка: растворяли таблетку в дистиллированной воде в ультразвуковой ванне, полученную суспензию центрифугировали и пропускали через двойной бумажный фильтр, фильтрат вводили в хроматографическую колонку.

Результаты и обсуждение

НЕМА S 1000 QL содержит группы четвертичного аммониевого основания, положительно заря-

женные в нейтральной и щелочной средах. В этих условиях полярные карбоксильные группы $ZnPc(COOH)_8$ и H_2DP диссоциированы и заряжены отрицательно, что позволило модифицировать сорбент по ионообменному механизму. В результате сохраняются анионообменные свойства сорбента, а появившиеся на поверхности гидрофобные фрагменты модификаторов могут также влиять на селективность разделения витаминов за счет взаимодействия с гидрофобными участками биомолекул.

Известно, что спектры поглощения тетрапиррольных молекул чрезвычайно чувствительны к взаимодействиям, происходящим в центре и на периферии молекулы. Поэтому для исследования эффектов слабых взаимодействий были сняты спектры модификаторов в отсутствие и в присутствии витаминов.

Некоторые витамины (B_{12} , B_2 , B_c , НА) практически не изменяют спектр фталоцианата в видимой области. В присутствии витаминов С, B_6 , НК и B_1 максимум в видимой области спектра при 690 нм практически исчезает, что свидетельствует о взаимодействии модификатора с витамином.

В случае H_2DP о взаимодействии с модификатором судили по изменению полосы Сорс (390 нм). В присутствии витаминов С и НК максимум полосы смещается гипсохромно на 10 нм, а в присутствии НА – батохромно на 10 нм, в присутствии B_1 полоса поглощения расщепляется на две полосы

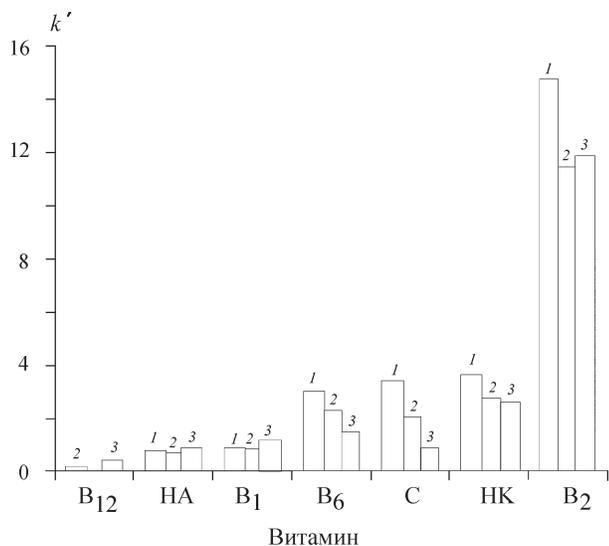


Рис. 1 Коэффициенты емкости водорастворимых витаминов на колонке NEMA S 1000 QL, модифицированной H_2DP (1 – 0,65 мкмоль/г, 2 – 1,3 мкмоль/г) и $ZnPc(COOH)_8$ (3 – 0,65 мкмоль/г) в ПФ: 8% АН-боратный буферный раствор (10 мМ; рН 9,18)

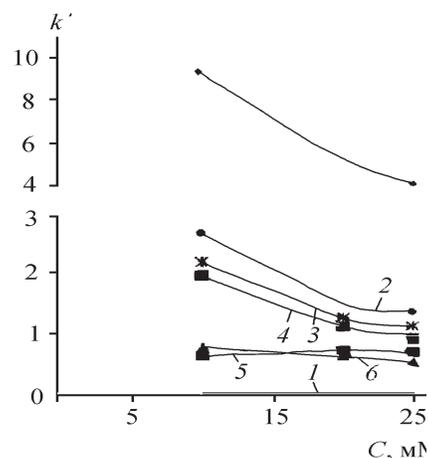


Рис. 2 Зависимость коэффициентов емкости водорастворимых витаминов от концентрации боратного буферного раствора (рН 9,18): 1 – НК, 2 – B_{12} , 3 – B_6 , 4 – С, 5 – НА, 6 – B_1 (содержание АН в подвижной фазе 8 об.%)

с максимумами 370 и 420 нм. Интенсивность полос поглощения в УФ-области спектра увеличивается для всех витаминов в присутствии модификаторов.

Коэффициенты емкости (k') витаминов зависят от природы и концентрации буферного раствора, содержания АН и природы модификатора. Они изменяются в достаточно широких пределах (рис. 1, 2). Введение в ПФ ацетонитрила (до 8 об.%) незначительно влияет на удерживание витаминов. Как видно из рис. 2, удерживание витаминов закономерно уменьшается при росте концентрации элюента, что вполне согласуется с теоретическими представлениями. Коэффициенты емкости витаминов B_1 , B_{12} , $НА \leq 1$; витаминов НК, B_2 , $B_c > 1$ изменяются в интервале 1,3–13,0; для витаминов С, B_6 коэффициенты емкости изменяются от 0,37 до 3,32 в различных подвижных фазах и колонках. Отметим, что при использовании фосфатного буферного раствора удерживание витаминов меньше, чем при использовании боратного, поскольку рН фосфатного буферного раствора меньше, чем боратного. При использовании фосфатного буферного раствора невозможно разделение витаминов B_1 , B_6 , С и НА.

Ниже представлены ряды удерживания витаминов на модифицированных колонках в боратном буферном растворе (рН 9,18).

Модификатор (мкмоль/г)	Боратный буфер (рН 9,18)
H_2DP (0,65)	$B_{12} < B_1 \leq НА \leq B_6 \leq С \leq НК < B_2$
H_2DP (1,3)	$B_{12} < B_1 \leq НА \leq B_6 \leq С \leq НК < B_2$
$ZnPc(COOH)_8$ (0,65)	$B_{12} < НА < С < B_6 < НК < B_2$

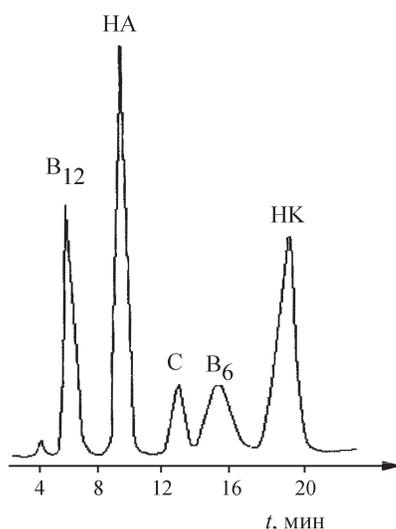


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси витаминов В₁₂, НА, С, В₆ и НК на NEMA S 1000 QL – ZnPc(COOH)₈(0,65 мкмоль/г); ПФ: боратный буферный раствор (10 мМ), рН 9,18

Селективность и порядок выхода исследуемых соединений не зависят от концентрации модификатора, хотя время удерживания всех исследуемых вита-

минов уменьшается при увеличении количества модификатора. Это может быть связано с экранированием большого количества групп четвертичного аммониевого основания на поверхности сорбента.

Удержание витамина В₁₂ мало ($k' \ll 1$), что связано, вероятно, с наибольшим размером гидратированного иона этого витамина. Последовательность в рядах удерживания обусловлена уменьшением радиусов гидратированных ионов, а также индивидуальными особенностями витаминов, в частности их кислотно-основными свойствами и склонностью к гидрофобным взаимодействиям.

Наибольшая селективность разделения витаминов наблюдается на колонке 3. Это связано, вероятно, с более сложным строением модификатора, наличием центрального атома металла (ЦАМ) и карбоксильных периферийных заместителей в молекулах фталоцианата, т.е. возможны р-р-взаимодействия, аксиальное связывание аналитов с ЦАМ, электростатические взаимодействия между ионами модификаторов и витаминов. В данных условиях на колонке 3 возможно разделение витаминов В₁₂, НА, С, В₆, НК, В₂ до базовой линии при скорости элюента 0,3 мл/

Т а б л и ц а 1

Основные характеристики определения витаминов ($n = 3$; $P = 0,95$)

Витамин	Уравнение градуировочного графика	R ²	Предел обнаружения, мг/мл	Диапазон линейности, мг/мл
В ₆	$y = 141,86x - 0,9124$	0,9697	0,004	0,013–0,067
В ₂	$y = 130,35x + 0,0642$	0,9997	0,002	0,007–0,033
В ₁₂	$y = 132,47x - 0,2379$	0,9760	0,001	0,003–0,033

Т а б л и ц а 2

Содержание витаминов в объектах ($n = 3$; $P = 0,95$)

Витамин	Пентовит, мг/табл		Фенюльс, мг/табл	
	паспортные данные	экспериментальные данные	паспортные данные	экспериментальные данные
В ₆	–	–	1	0,97±0,03
В ₂	–	–	2	1,99±0,01
В ₁₂	0,05	0,05 ± 0,01	–	–

мин (рис. 3). Время выхода V_2 при этом составляет 1 час 40 мин, на хроматограмме не показано.

Для определения витаминов в фармацевтических препаратах были получены хроматограммы на колонке 3 при использовании в качестве ПФ боратного буфера (10 мМ; рН 9,18). Содержание витаминов в препаратах определяли по градуировочным графикам. Уравнения градуировочных графиков и основные параметры определения водорастворимых

витаминов приведены в табл. 1. Результаты определения витаминов приведены в табл. 2. Полученные результаты согласуются с паспортными данными анализируемых образцов.

Таким образом, показана перспективность системы НЕМА S 1000 QL (модифицированный $ZnPc(COOH)_8$ -боратный буфер (10 мМ, рН 9,18)) для определения водорастворимых витаминов в конкретных объектах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брыкина Г.Д., Жарикова В.С., Пирогов А.В., Шпигун О.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2003. **44**. С.409.
2. Брыкина Г.Д., Матусова С.М., Шпигун О.А. и др. // ЖАХ. 2004. **59**. С. 301.
3. Heudi O., Kilinc T., Fontannaz P. // J. Chromatogr.A. 2005. **1070**. P. 49.
4. Уварова М.И., Брыкина Г.Д., Шпигун О.А. // ЖАХ. 2000. **55**. С. 1014.

Поступила в редакцию 23.06.05

HPLC WATER-SOLUBLE VITAMINS ON THE MODIFIED SORBENTS

V.S. Mochalova, G.D. Brykina, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry)

The chromatographic behavior HEMA S 1000 QL, modified with zink octa-4,5-carboxyphthalocynine and 3,8-di(1-methoxyethyl)deuteroporphyrin IX was studied. A model mixture of the water-soluble vitamins as sorbats was investigated. The presence poor interactions between molecules of the modifiers and vitamins was corroborated by absorption spectrum. The conditions of the vitamins separation was found. The pharmaceuticals was analyzed in optimal conditions.