

УДК 543.545

РАЗДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ НА СИЛИКАГЕЛЕ, МОДИФИЦИРОВАННОМ НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫМИ L-ЦИСТЕИНОМ

Я.А. Полякова, И.А. Ананьева, Е.Н. Шаповалова, А.Г. Мажуга, О.А. Шпигун

(кафедры аналитической и органической химии; e-mail: irishan@mail.ru)

Получен силикагель, функционализированный 3-аминопропилтриэтоксисилоном и наночастицами золота, стабилизированными L-цистеином ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$). Изучено влияние pH и содержания ацетонитрила в подвижной фазе на удерживание и селективность разделения восьми витаминов. Предложены хроматографические условия, позволяющие разделить смеси витаминов C, B3, B12, B5 и B1, B2, B6, B10. Установлено, что на синтезированном сорбенте $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$ в изократическом режиме элюирования возможно разделение смеси витаминов C, B3, B12, B5 за 8 мин, и смеси витаминов B1, B2, B6, B10 за 12 мин.

Ключевые слова: ВЭЖХ, модифицированные силикагели, наночастицы золота, L-цистеин, водорастворимые витамины.

Водорастворимые витамины составляют большую группу соединений, отличающихся как по строению, так и по свойствам. В их состав входят тиамин (B1), рибофлавин (B2), никотинамид или никотиновая кислота (B3), пантотеновая кислота или пантотенат кальция (B5), пиридоксин (B6), фолиевая кислота (B9), *n*-аминобензойная кислота (B10), цианокобаламин (B12), аскорбиновая кислота (C) [1]. В настоящее время существует задача определения витаминов в различных объектах – продуктах питания, кормах, биологических тканях, лекарственных препаратах.

Одним из основных методов определения водорастворимых витаминов является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Этот метод позволяет одновременно определять сразу несколько витаминов, при этом чаще всего определение витаминов проводят в обращенно-фазовом режиме либо с градиентным элюированием, либо с использованием ион-парного реагента [2]. Для разделения сложных смесей витаминов остается актуальной разработка сорбентов с использованием новых подходов и современных технологий. Интересным направлением развития ВЭЖХ является использование силикагеля, модифицированного наночастицами золота, для разделения широкого круга полярных соединений [3]. Подобные органические кремнеземные материалы соединяют в себе уникальные свойства наночастиц золота и отличные механические свойства силикагеля.

Получен силикагель, функционализированный 3-аминопропилтриэтоксисилоном (АПТЭС) и на-

ночастицами золота (НЧЗ), стабилизированными L-цистеином ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$). Цель настоящей работы состояла в изучении хроматографических свойств синтезированной неподвижной фазы для высокоэффективной жидкостной хроматографии при разделении смесей водорастворимых витаминов.

Экспериментальная часть

Реагенты и аппаратура. Для синтеза сорбента в работе использовали следующие реагенты: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ («х.ч.») («Merck», Германия), $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$ («ос.ч.») («Merck», Германия), L-цистеин («ос.ч.») («Sigma-Aldrich», США), АПТЭС (95%, «Acros Organics», США), этиловый спирт («х.ч.») («Sigma-Aldrich», США).

В качестве матрицы для синтеза сорбентов использовали силикагель Kromasil 100-5-Sil (сферический, размер частиц 5 мкм, площадь поверхности $300 \text{ м}^2/\text{г}$, размер пор 100 Å, «Ekachemicals», Швеция).

Фосфатный и аммонийно-ацетатный буферные растворы готовили, как указано в работе [4]. Для приготовления буферных растворов использовали ацетат аммония («ч.д.а.») («Лабтех», Россия), фосфорную кислоту (85%), уксусную кислоту (99,7%) («Реахим», Россия), триэтиламин (99%, «Acros Organics», США). В качестве органического модификатора подвижной фазы применяли ацетонитрил («для хроматографии», «Panreac», Испания).

В работе использовали следующие витамины: тиамина хлорид («ч.д.а.»), рибофлавин («ч.д.а.»),

никотиновую кислоту («ч.д.а.»), пантотенат кальция («ч.д.а.»), пиридоксин («ч.д.а.»), фолиевую кислоту (98%), *n*-аминобензойную кислоту («ч.д.а.»), цианокобаламин («ч.д.а.»), аскорбиновую кислоту («ч.д.а.»). Стандартные растворы витаминов готовили по методике [1]. Раствор аскорбиновой кислоты сохраняет стабильность в течение суток, растворы остальных витаминов – в течение двух недель.

В работе использовали жидкостной хроматограф «LC-20 Prominence» («Shimadzu», Япония) с диодно-матричным детектором «SPD-M20A» («Shimadzu», Япония); жидкостной хроматограф «Shimadzu» SLC-10A со спектрофотометрическим детектором «Shimadzu» SPD-10AV и насосом «LC-10AT2» («Shimadzu», Япония). Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LC Solution фирмы «Shimadzu». Скорость подачи элюента составляла 0,5–1,0 мл/мин, объем петли дозатора составлял 20 мкл, ввод пробы осуществляли шприцом объемом 50 мкл.

Перед использованием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой ванне «Сапфир 6580» (рабочая частота 35 кГц, мощность 60 Вт, НПФ «Сапфир», Россия) в течение 10 мин для снижения колебаний фонового сигнала и обеспечения нормальной работы насоса; pH водных растворов измеряли на pH-метре «pH-410» («Аквилон», Россия). Синтезированным сорбентом заполняли стальную колонку размером 100×4,6 мм с помощью насоса «Кнауер К-1900» под давлением 150–200 бар суспензионным способом.

Атомно-абсорбционное определение золота проводили на атомно-абсорбционном спектрометре «Contr AA300» (пламя C₂H₂/воздух, «Analytic Jena», Германия), высота над срезом горелки 6 мм, расход горючего 45 л/ч, воздуха – 644 л/ч. Линия Au 242,8 нм. Элементный анализ образцов прово-

дили на анализаторе «Elementar Vario Micro CUBE» («Elementar», Германия).

Для получения микрофотографий наночастиц золота использовали просвечивающий электронный микроскоп «LEO912 AB OMEGA» (ускоряющее напряжение 100 кВ, «Carl Zeiss SMT AG Oberkochen», Германия). Образцы готовили нанесением 1–2 мкл золя на покрытую формваром медную сетку (*d* = 3,05 мм), которую затем сушили на воздухе. Для получения микрофотографий сорбентов использовали сканирующий электронный микроскоп «JEOL JSM-6390LA» (ускоряющее напряжение 20 кВ, «JEOL», Япония). Морфологию образцов определяли в режиме вторичных электронов SEI. Для элементного микроанализа поверхности образцов использовали энергодисперсионную систему «EX-54 175 JMH» («JEOL», Япония).

Измерение ξ-потенциала поверхности синтезированных сорбентов осуществляли с помощью прибора «Malvern ZetaSizer» («Malvern», Великобритания). В работе использовали наночастицы золота (10 нм), синтезированные по методу Туркевича [5]. Полученный раствор НЧЗ хранили в холодильнике при температуре около 4°C (в этих условиях раствор сохранялся длительное время).

Синтез сорбента проводили по следующей методике: силикагель предварительно модифицировали 3-аминопропилтриэтоксисиланом [6], а затем аминированный силикагель модифицировали наночастицами золота (10 нм), стабилизированными цитрат-ионами [1] Результат элементного анализа: 3,6%С, 0,7%Н, 1,0%N. Схематическое строение модифицированного НЧЗ силикагеля приведено на рис. 1.

Для замены на аминированном силикагеле лигандов, стабилизирующих наночастицы золота, L-цистеином 1,700 г порошка аминированного

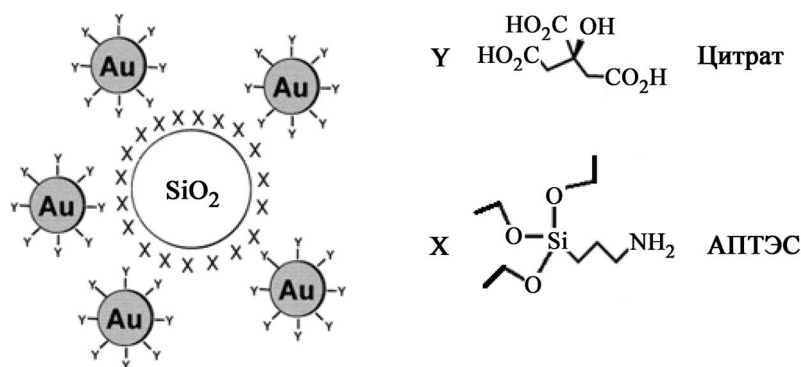


Рис. 1. Схематическое строение функционализированного аминокетонами силикагеля, модифицированного НЧЗ, стабилизированными цитрат-ионами

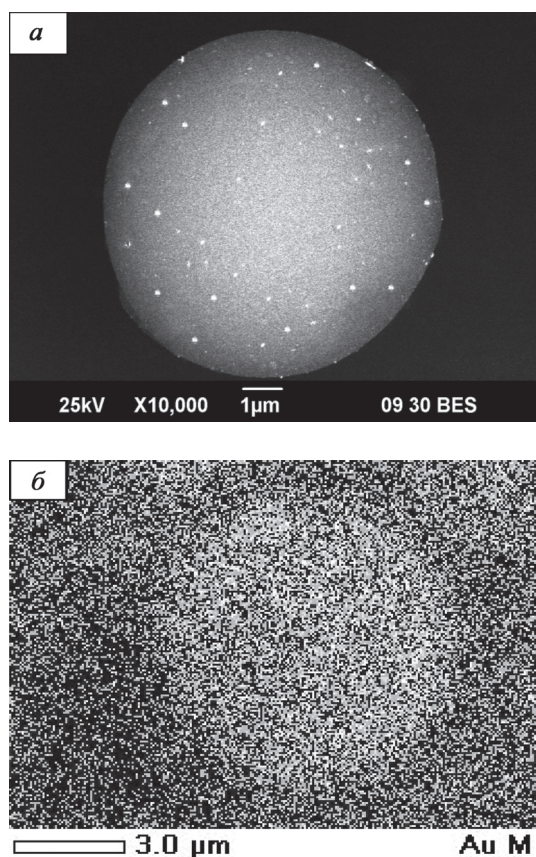


Рис. 2. СЭМ-микрофотографии (а) и карты распределения золота (б) сорбента $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$

силикагеля, модифицированного золотыми наночастицами, стабилизированными цитрат-ионами, суспендировали в 30,0 мл деионизованной воды и при непрерывном перемешивании добавляли 0,052 г L-цистеина (0,43 ммоль), растворенного в 10,0 мл этанола. Перемешивание продолжали в течение 12 ч, затем сорбент отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном, промывали этанолом и хранили на воздухе в бюксе. Результат элементного анализа: 3,9%С, 0,76%Н, 1,2%N. Методом ААС показано, что масса адсорбированного на поверхности золота составила $2,8 \pm 0,3$ мг/г синтезированного сорбента.

Т а б л и ц а 1

Измеренные ξ -потенциалы синтезированных сорбентов

Сорбент	ξ -потенциал (мВ)
SiO_2	-10,0 (рН 6)
$\text{SiO}_2\text{-NH}_2$	25,4
$\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$	19,0

Как видно из рис. 2, на котором приведены микрофотографии сорбентов и карты распределения золота по поверхности силикагеля, на поверхность $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$ (рис. 2, а) НЧЗ адсорбировались достаточно равномерно, на фотографии видны золотые агрегаты (самые яркие точки), однако их количество невелико (рис. 2, б).

Для подтверждения модифицирования наночастицами золота сравнили ξ -потенциалы синтезированных сорбентов. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют об изменении заряда поверхности силикагеля после его модифицирования НЧЗ, стабилизированными L-цистеином.

Результаты и их обсуждение

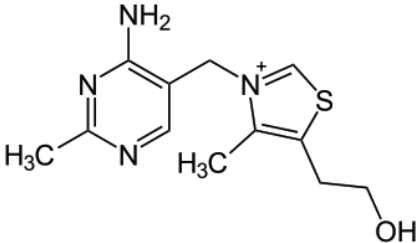
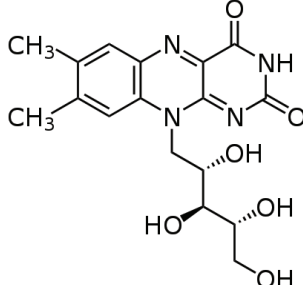
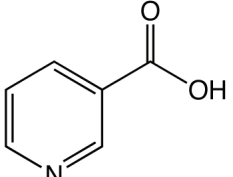
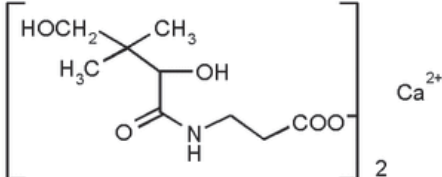
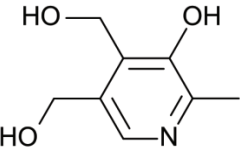
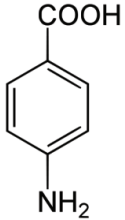
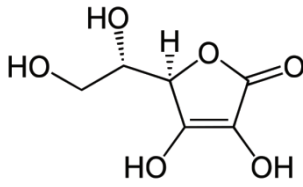
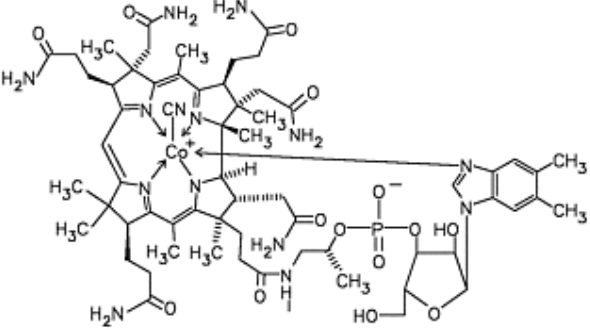
В работе исследовали возможность разделения витаминов на сорбенте $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$. Структуры исследованных в работе витаминов приведены в табл. 1. Поскольку синтезированный нами сорбент на основе функционализированного силикагеля и стабилизированных L-цистеином НЧЗ является полярным, можно предположить, что удерживание адсорбатов осуществляется главным образом за счет образования водородных связей, диполь-дипольных или электростатических взаимодействий.

Некоторые характеристики витаминов, такие как константа кислотности и основности, $\log P$, а также длина волны максимума поглощения представлены в табл. 2. Детектирование проводили при 270 нм, поскольку все витамины, за исключением В5, поглощают в этой области спектра. Витамин В5 регистрировали при длине волны 205 нм.

В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и буферных растворов. Для подбора оптимальных условий разделения витаминов необходимо изучить влияние на их удерживание различных факторов, наиболее значимыми из которых являются рН подвижной фазы и содержание органического модификатора в элюенте. Удерживание витаминов уменьшается с ростом содержания буферного раствора. Витамины В1, В2, В6, В10 на исследуемом сорбенте удерживаются слабо при содержании в элюенте ацетонитрила менее 90%, их время удерживания близко к мертвому времени колонки. При увеличении содержания ацетонитрила больше 90% удерживание и селективность быстро растут. Удерживание витаминов В3, 5, 12 и С превосходит мертвое время колонки уже при содержании в подвижной фазе 5% ацетонитрила, хорошая селективность при разделении витаминов С, В3, В12 и В5 получена уже при содержании 25% органического модификатора в подвижной фазе.

Таблица 2

Структура исследованных соединений

 <p>Тиамин (B1)</p>	 <p>Рибофлавин (B2)</p>
 <p>Никотиновая кислота (B3)</p>	 <p>Пантотонат кальция</p>
 <p>Пиридоксин (B6)</p>	 <p><i>p</i>-Аминобензойная кислота (B10)</p>
 <p>Аскорбиновая кислота (C)</p>	 <p>Цианокобаламин (B12)</p>

Поскольку почти все витамины и сам цистеин содержат в своем составе кислотные и основные группы, то варьируя pH подвижной фазы, можно изменять время удерживания витаминов и селективность разделения. Влияние pH элюента исследовали в диапазоне 2,7–7,0, поскольку в более кислой области pH нецелесообразно работать с сорбентами на основе силикагеля, а в более ще-

лочной (pH > 7) некоторые витамины неустойчивы. В качестве водного компонента подвижной фазы в диапазоне pH от 2 до 3 использовали фосфорную кислоту разной концентрации, при pH от 3,5 до 6,0 – 50мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор, а при pH 6–7 применяли 50 мМ фосфатный буферный раствор. На рис. 3 представлены зависимости факторов емкости витаминов от

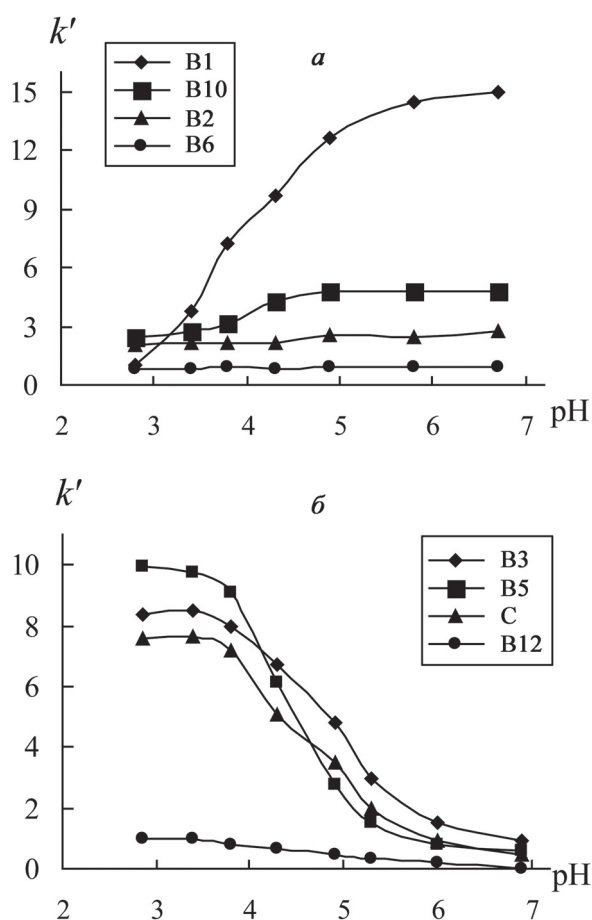


Рис. 3. Влияние pH на факторы удерживания витаминов. Колонка $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$ (100×4.6 мм). ПФ: (а) 92 об.% АСN – 8 об.% аммонийно-ацетатный буферный раствор (50 мМ), (б) 5 об.% АСN – 95 об.% аммонийно-ацетатный буферный раствор (50 мМ). $\lambda = 270$ нм. Концентрация витаминов В3, В5, С – 0.5 мг/мл, В1, В6, В10 – 1 мг/мл, В12 – 5 мг/мл, В2 – 0.04 мг/мл.

pH, из которых отчетливо видно, что удерживание витаминов В1 и В10 растет при увеличении pH, а удерживание витаминов В3, В5, С и В12 падает с ростом pH. Факторы удерживания В2 и В6 практически не изменяются.

В исследуемом диапазоне pH цистеин является цвиттер-ионом (pK_a 1,71; 8,33 и 10,78; pI 5,07). С ростом pH доля формы с диссоциированной карбоксильной группой увеличивается, а доля формы с протонированной аминогруппой уменьшается. Наиболее сильно с ростом pH увеличивается удерживание тиамина. Так, при $pH < 3$ тиамин практически не удерживается, при дальнейшем росте pH до 5 его удерживание увеличивается, а затем мало изменяется. Как видно из данных табл. 2, pK_a тиамина составляет 5,05, следовательно, при увеличении pH с 3 до 5 положительный заряд тиамин уменьшается, а при pH в диапазоне 5–7 тиамин

переходит в форму свободного основания за счет депротонирования азота пиримидинового кольца. Таким образом, можно сделать вывод, что удерживание тиамин определяется электростатическими взаимодействиями с карбоксильными группами цистеина. Удерживание *n*-аминобензойной кислоты также растет с увеличением pH от 2,7 до 5,0, а при дальнейшем увеличении pH остается постоянным, что связано с уменьшением доли формы с протонированной аминогруппой при приближении к pH 5 (для В10 pK_a составляет 2,7 и 4,7). Характер зависимости удерживания для витаминов В3, В5 и С от pH одинаков. Никотиновая кислота в диапазоне pH 2,7–7,0 является цвиттер-ионом. С увеличением pH увеличивается доля формы с диссоциированной карбоксильной группой и уменьшается степень протонирования атома азота, что приводит к уменьшению удерживания. Удерживание витамина В5 сохраняется постоянным при увеличении pH от 2,5 до 4,0, а затем резко уменьшается. Это связано с тем, что с увеличением pH становится большим значение pK_a (4,41) В5 переходит в форму аниона, который, как и витамин В3, слабо взаимодействует с отрицательно заряженной поверхностью цистеина. Этим объясняется и уменьшение удерживания аскорбиновой кислоты с ростом pH ($pK_a = 4,1$). Удерживание цианокобаламина слабо зависит от pH, поскольку в исследуемом диапазоне pH он практически не меняет свой заряд ($pK_a = 1,59$). Удерживание рибофлавина практически не зависит от pH, поскольку он не содержит групп, способных к ионизации в исследуемом диапазоне pH. Аналогичная ситуация наблюдается для пиридоксина, который обладает основными свойствами и при pH 2,7–5,6 заряжен положительно.

Таким образом, полученные зависимости позволяют сделать вывод, что основной вклад в удерживание витаминов на синтезированном сорбенте вносят электростатические взаимодействия сорбатов с L-цистеином. Стоит также отметить, что если бы на поверхности силикагеля имелось большое количество незакрытых аминогрупп, то характер удерживания витаминов был бы абсолютно другой, что также косвенно свидетельствует о высокой степени покрытия amino-силикагеля модифицированными НЧЗ. Порядок выхода витаминов не полностью соответствует изменению их гидрофобности (табл. 3), что свидетельствует о более сложном механизме их удерживания.

Из рис. 3 также видно, что оптимальным значением pH с точки зрения продолжительности анализа и приемлемого разрешения пиков витаминов

Таблица 3

Некоторые характеристики исследуемых витаминов

Витамин	pK_a	$\text{Log}P$	λ , нм	Витамин	pK_a	$\text{Log}P$	λ , нм
B1	5,5; 11,41	-4,6	234; 256	B6	5,6; 8,6	-0,77	289
B2	10,2	-1,46	224; 266; 362; 443	B10	2,7; 4,7	0,83	284
B3	2,07; 4,9	-0,37	262	B12	1,59	-	361
B5	4,41	-0,86	200	C	4,1; 11,2	-1,85	254

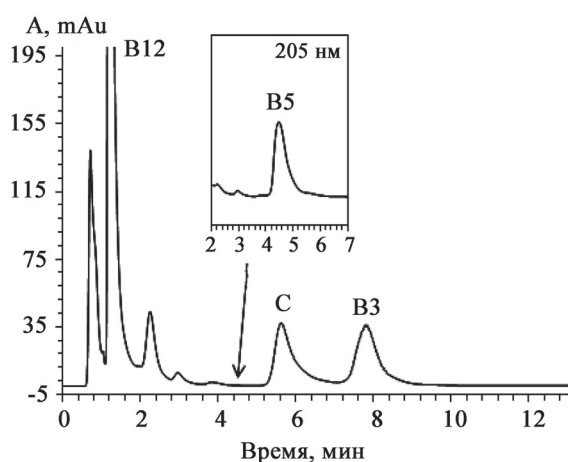


Рис. 4. Разделение витаминов С, В3, В12, В5 на $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$ (100×4.6 мм). ПФ: 25% АСН – 75% аммонийно-ацетатный буферный раствор (50 мМ, рН 3.8). $\lambda = 270$ нм. Концентрация витаминов В3, В5, С – 0,5 мг/мл, В12 – 5 мг/мл

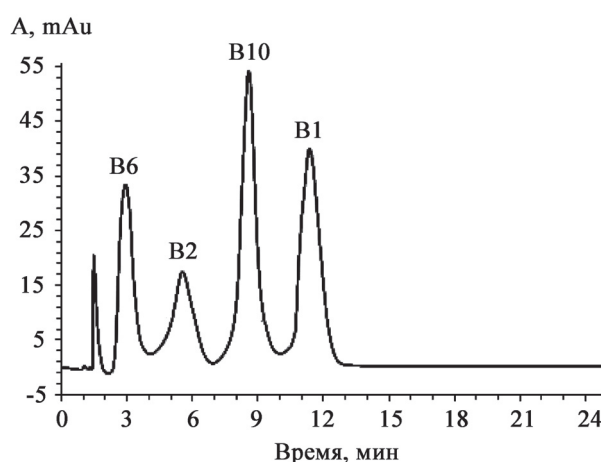


Рис. 5. Разделение витаминов В1, В2, В6, В10 на $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$ (100×4.6 мм). ПФ: 92% АСН – 8% аммонийно-ацетатный буферный раствор (50 мМ, рН 3.8). $\lambda = 270$ нм. Концентрация витаминов В1, В6, В10 – 1 мг/мл, В2 – 0,04 мг/мл

является рН 3,8. К тому же в кислой среде витамины более стабильны. Приемлемое разрешение пиков ($R_s > 1,0$) и время анализа (12 мин) разделения витаминов В1, В2, В6, В10 достигается при содержании в элюенте 92% ацетонитрила. Хромограммы разделения смесей витаминов С, В3, В12, В5 и В1, В2, В6, В10 приведены на рис. 4 и 5 соответственно. Пики витаминов С и В3 немного размыты (рис. 4), что свидетельствует о наличии дополнительных взаимодействий исследуемых соединений с поверхностью силикагеля. Разделение смеси всех восьми исследуемых соединений возможно в дальнейшем при использовании градиентного элюирования.

Таким образом, проведенные исследования открыли еще одну возможную область применения модифицированного НЧЗ силикагеля – разделение водорастворимых витаминов. На синтезированном

сорбенте $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$ можно проводить разделение смесей витаминов С, В3, В12, В5 в изократическом режиме элюирования за 8 мин, а смеси витаминов В1, В2, В6, В10 – за 12 мин. Предложенный подход является альтернативой применению стандартных обращенно-фазовых колонок. Использование градиентного режима элюирования позволит в дальнейшем проводить определение витаминов в лекарственных препаратах или витаминизированных продуктах.

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук С.В. Савилу и мл. науч. сотр. Е.А. Нестеровой (кафедра физической химии химического факультета МГУ) за помощь в проведении микроскопических исследований, канд. хим. наук Е.В. Голубиной (кафедра физической химии химического факультета МГУ) за помощь в проведении измерений ξ -потенциалов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №15-03-05979а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бендрышев А.А., Пащикова Е.Б., Пирогов А.В., Шпигун О.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2010. Т. 51. С. 315.
2. Jedlička A., Klimeš J. // Chem. Pap. 2005. Vol. 59. P. 202.
3. Ананьева И.А., Елфимова Я.А., Мажуга А.Г., Рудаковская П.Г., Шаповалова Е.Н., Зык Н.В., Шпигун О.А. // Сорбц. хромат. процессы. 2011. Т. 11. С. 281.
4. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М., 1991.
5. Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. // Discuss. Faraday Soc. 1951. Vol. 11. P. 55.
6. Патент РФ №2203730, 27.12.2001.

Поступила в редакцию 11.11.15

SEPARATION OF WATER SOLUBLE VITAMINS ON SILICA MODIFIED L-CYSTEINE-STABILIZED GOLD NANOPARTICLES BY HPLC

Y.A. Polyakova, I.A. Ananieva, E.N. Shapovalova, A.G. Majouga, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry; Division of Organic Chemistry)

Prepared silica functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane and L-cysteine-stabilized gold nanoparticles ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-cysteine}$). The influence of the content of acetonitrile in the mobile phase and pH on the retention and separation selectivity 8 vitamins was studied. Chromatographic conditions allowing to separate mixtures of vitamins C, B3, B12, B5 and B1, B2, B6, B10 were suggested. The possibility of separating a mixture of vitamins C, B3, B12, B5 for 8 min, and mixtures of vitamins B1, B2, B6, B10 in 12 min. on the synthesized stationary phases $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-cysteine}$ in isocratic elution was shown.

Key words: HPLC, modified silica, gold nanoparticles, L-cysteine, water soluble vitamins.

Сведения об авторах: Полякова Яна Андреевна – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (elfimova_16@list.ru); Ананьева Ирина Алексеевна – ст. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (irishan@mail.ru); Шаповалова Елена Николаевна – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (shapovalova_e_n@mail.ru); Мажуга Александр Георгиевич – доцент кафедры органической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (alexander.majouga@gmail.com.); Шпигун Олег Алексеевич – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, чл.-корр. РАН, докт. хим. наук (shpiguno@yandex.ru).