

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ А И Е В ТОНКОМ СЛОЕ ПРИ СОВМЕШНОМ ПРИСУТСТВИИ

Тринеева О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И.

ФБГОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 19.12.2014 г.

Аннотация. Разработана методика разделения и определения жирорастворимых витаминов А и Е методом ТСХ при совместном присутствии. Установлена возможность теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения данных веществ в тонком слое. ТСХ-методика для разделения витаминов была сравнена с методиками, основанными на применении ВЭЖХ. Установлено, что в зависимости от целей анализа использование методики ТСХ, обладающей характеристиками, сопоставимыми с методом ВЭЖХ, в определенных условиях, более предпочтительно в виду низкой стоимости и экспрессности анализа. Методика может быть использована в контроле качества комплексных поливитаминных препаратов.

Ключевые слова: токоферола ацетат, ретинола ацетат, тонкослойная хроматография, жирорастворимые витамины.

Abstract. A method for separation and determination of fat-soluble vitamins A and E, TLC when present together. The possibility of a theoretical approach to the selection of optimal conditions for the chromatographic separation of these substances in a thin layer. TLC method for separating vitamins was compared with the methods based on the use of HPLC. It is found that, depending on the purpose of analysis using TLC method having characteristics comparable with HPLC, under certain conditions, more preferably in view of low cost and rapidity of analysis. The method can be used in quality control of complex multivitamin preparations.

Keywords: tocopherol acetate, retinol acetate, thin layer chromatography, fat-soluble vitamins.

В настоящее время существует проект ОФС «Методы количественного определения витаминов», прошедший научное редактирование и предназначенный для включения в ГФ XIII издания [1]. В данной статье изложены общие принципы определения жирорастворимых витаминов А и Е (рис. 1) в субстанциях и лекарственных формах с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Приведены типовые методики, позволяющие количественно определять витамин А (ретинол, ретинола ацетат и ретинола пальмитат) и витамин Е (α-токоферол и α-токоферола ацетат) при совместном присутствии в лекарственных препаратах и масляных растворах. Определение каждого витамина можно проводить отдельно, детектируя витамин А при 326 нм и витамин Е при 292 нм. Возможно также одновременно определять витамины

А и Е, проводя детектирование при длине волны 300 нм. Индивидуальные препараты витамина А рекомендовано определять методом прямой спектрофотометрии в УФ-области. В ГФ РФ XII издания включена ФС на субстанцию «α-токоферола ацетат» [2], в соответствии с которой идентификация витамина осуществляется методами ИК-спектроскопии и УФ-спектрофотометрии. Количественный анализ рекомендовано проводить методом газовой хроматографии. Согласно данным литературы [3], метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), обладая всеми преимуществами

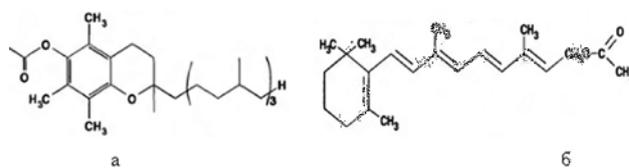


Рис. 1. Структурные формулы токоферола ацетата (а) и ретинола ацетата (б).

хроматографического процесса, характеризуется большей экономической доступностью и простотой выполнения. Поэтому ТСХ, в зависимости от целей анализа, может быть рекомендован в качестве метода-выбора для оценки качества лекарственных препаратов.

Цель работы - изучение различных элюирующих систем и возможности теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения витаминов А и Е методом ТСХ при совместном присутствии.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Выбор проявителя осуществляли с учетом таких требований как специфичность, высокая чувствительность, доступность и высокое качество получаемой картины. Для обнаружения пятен ретинола ацетата (ФС 42-7811-97) [4] и токоферола ацетата (ФС 42-7843-97) [5], которые выбраны в качестве стандартных образцов для разработки методики, были использованы реагенты, предложенные в литературе [3,6-10]: конц. азотная кислота, хлорид сурьмы и 5% спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты (ФМК). Данные таблицы 1 показывают, что первый проявитель обнаруживает только хроматографические зоны витамина Е, второй – только зоны витамина А, тогда как – ФМК проявляет оба витамина. Детектирующим реагентом, отвечающим всем требованиям, является 5% спиртовой раствор ФМК, так как, по нашим данным, предел обнаружения с его помощью составил $1 \cdot 10^{-7}$ г (0,1 мкл раствора с содержанием 1 мг/мл) для витамина А и $1 \cdot 10^{-6}$ г (0,1 мкл раствора с содержанием 10 мг/мл) для витамина Е, что выше чувствительности при использовании конц. азотной кислоты ($5 \cdot 10^{-6}$ г; 0,5 мкл раствора с содержанием 10 мг/мл) и сопоставимо по чувствительности с определением данных витаминов методом ВЭЖХ [11].

Таблица 1

Детектирующие реагенты для определения ЖРВ методом ТСХ

№ п/п	Реагент	Витамин Е	Витамин А
1	Конц. азотная кислота	Оранжево-красные зоны на белом фоне	-
2	Хлорид сурьмы (III)	-	Быстро исчезающие синие зоны на белом фоне
3	5% спиртовой ФМК	Темно-синие зоны на желто-зеленом фоне	

Для обоснования возможности использования теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения ретинола и токоферола ацетатов необходимо было изучить влияние полярности элюентов на хроматографическую подвижность витаминов в тонком слое.

В эксперименте изучено более десяти типов элюирующих систем с различными значениями полярности (табл. 2). Исследовали системы, предложенные в литературе, а также апробированы новые хроматографические системы. Для каждой элюирующей системы рассчитаны полярность (P') [12], а также такие хроматографические параметры витаминов А и Е, как величина R_f , коэффициент распределения (K) и показатель селективности сорбции (L).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оптимальные величины R_f , согласно известной работе [13], и лучшее качество хроматографических зон было достигнуто в системах № 6-8 (табл. 2). Вид хроматограмм спиртового раствора смеси стандартных образцов ретинола ацетата и токоферола ацетата (1 мкл) в системах гексан-хлороформ (4:1) и гексан-хлороформ (5:1) приведены на рис. 2.

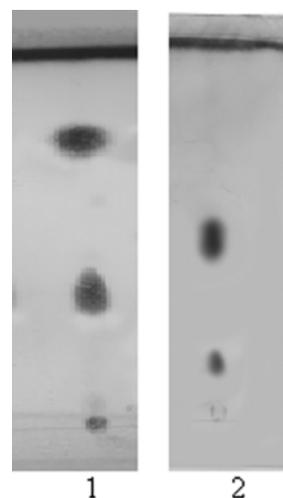


Рис. 2. Вид хроматограмм спиртового раствора смеси стандартных образцов ретинола ацетата и токоферола ацетата (1 мкл) в системах гексан-хлороформ (4:1) – точка 1 и гексан-хлороформ (5:1) – точка 2.

При варьировании соотношением гексана и хлороформа в двухкомпонентной подвижной фазе, были получены кривые зависимости величины относительной скорости перемещения веществ от процентного содержания каждого ком-

Таблица 2

Параметры хроматографического разделения смеси стандартных образцов витаминов А и Е

№ п/п	Состав элюента	R'	Величина R _f		К		L
			А	Е	А	Е	
1	Гексан	0	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.001	99	99	1
2	Гексан-бензол (29:1)	0.15	0.01 ± 0.001	0.02 ± 0.001	99	49	2.02
3	Гексан-бензол (19:1)	0.22	0.01 ± 0.001	0.02 ± 0.001	99	49	2.02
4	Гексан-бензол (14:1)	0.29	0.01 ± 0.001	0.08 ± 0.001	99	11,5	8.61
5	Гексан-хлороформ (10:1)	0.4	0.04 ± 0.001	0.07 ± 0.001	24	13.3	1.8
6	Гексан-хлороформ (5:1)	0.73	0.13 ± 0.001	0.46 ± 0.002	6.7	1.17	5.71
7	Гексан-хлороформ (4:1)	0.88	0.24 ± 0.001	0.52 ± 0.001	3.17	0.92	3.45
8	Гексан-хлороформ (3:1)	1.1	0.36 ± 0.001	0.76 ± 0.002	1.79	0.29	6.17
9	Гексан-хлороформ (2:1)	1.47	0.85 ± 0.001	0.92 ± 0.001	0.176	0.087	2.02
10	Гексан-хлороформ (1:1)	2.2	0.92 ± 0.001	0.95 ± 0.001	0.087	0.053	1.64
11	Хлороформ	4.4	0.95 ± 0.001	0.98 ± 0.001	0.053	0.02	2.65

понента в элюенте (рис. 3, а и б). Полученные зависимости позволили установить, что для достижения оптимальных величин R_f исследуемых витаминов содержание гексана и хлороформа в системе должно быть в определенном соотношении по объему (табл. 3).

Таблица 3

Оптимальное соотношение гексана и хлороформа в двухкомпонентной системе при определении витаминов методом ТСХ

№ п/п	Витамин	Содержание компонентов, % (по объему)	
		Гексан	хлороформ
1	Витамин Е	75-85	15-25
2	Витамин А	72-80	20-30

По полученным данным построена кривая зависимости величины относительной подвижности (R_f) витаминов А и Е (рис. 4) от полярности системы (R') в интервале от 0 до 4.4 ед. полярности. Как видно из графика на рис. 4, в интервале

полярностей от 0 до 0.4 ед. витамины на хроматограмме разделяться не будут (значения R_f близкие по величине). При достижении величины R'=1.5 ед. и более, значение параметра R_f исследуемых веществ перестает зависеть от полярности элюента, и определяемые компоненты не сорбируются неподвижной фазой (R_f → 1). Следовательно для достижения наилучшего разделения необходимо работать в узком диапазоне от 0.5 до 1.2 ед. полярности.

При более детальном изучении влияния полярности системы на величину R_f в диапазоне от 0.2 до 2.0 ед., был выбран интервал значений R' элюента, в котором данные зависимости приобретают линейный характер (от 0.4 до 1.1 ед. полярности системы для витамина Е и от 0.7 до 1.5 для витамина А) (рис. 5). Уравнения и коэффициенты корреляции приведены на рис. 5. С помощью предложенной зависимости можно подбирать различные системы для разделения витамина А и Е в тонком слое сорбента, чтобы величина R_f укла-

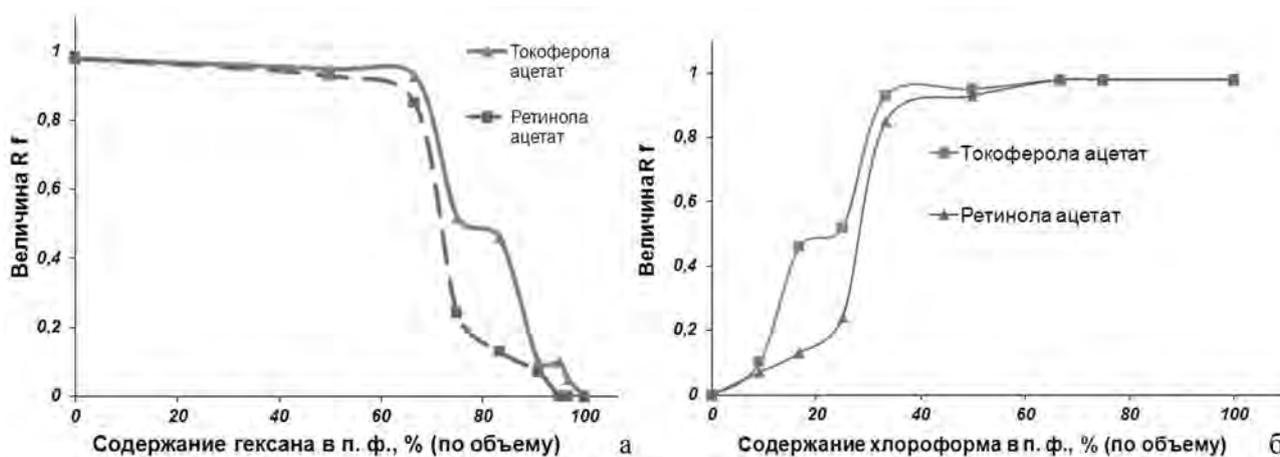


Рис. 3. Зависимость относительной скорости перемещения ЖРВ от содержания гексана (а) и хлороформа (б) в подвижной фазе (неподвижная фаза – силикагель).

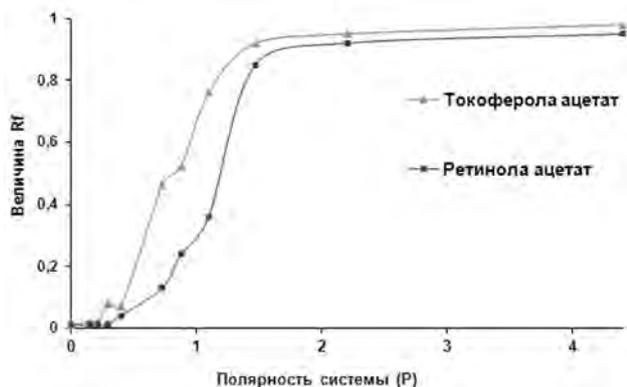


Рис. 4. Вид зависимости величины R_f токоферола ацетата и ретинола ацетата от полярности элюента.

дывалась в оптимальные значения [13]. Таким образом, интервал полярностей элюента может варьировать в достаточно узком диапазоне от 0.62 до 0.93 ед. (для витамина Е) и от 0.95 до 1.26 (для витамина А) при совместном определении.

При анализе значений селективности сорбции (табл. 2), установлено, что наилучшее разделение хроматографических зон достигается также в системах № 6-8 (интервал полярностей 0.73 – 1.1). Однако, на основании совокупности таких показателей, как величина R_f значение коэффициента селективности сорбции (L) и формы хроматографических зон разделяемых веществ была выбрана в качестве оптимальной система № 8.

Таким образом, по совокупности полученных результатов были выбраны условия хроматографического разделения витаминов А и Е в тонком слое при совместном присутствии: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» 10x10 см с полимерной подложкой; элюент – гексан:хлороформ (3:1); проявитель – 5% спиртовой раствор ФМК; объем пробы – 0.5 мкл растворов токоферола ацетата и ретинола ацетата с содержанием 10 мг/мл и 1 мг/

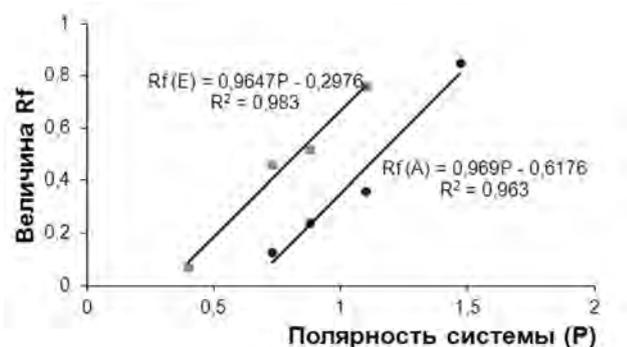


Рис. 5. Линейные зависимости величины R_f от значения полярности элюента.

мл соответственно; время насыщения хроматографической камеры парами элюента – 20 мин; время элюирования – 25 мин; время выдерживания пластинки в термостате при $t^{\circ} = 50 - 60^{\circ}C$ - 5 – 7 мин.

Разработанная методика разделения и определения витаминов А и Е была апробирована на витаминном лекарственном препарате «Аевит» (ФС 42-1699-95) [14]. Вид хроматограммы раствора содержащего 1 капсулы «Аевит» в 10 мл спирта и смеси стандартных образцов ретинола ацетата и токоферола ацетата в системе гексан-хлороформ (3:1) представлен на рис. 6.

Для обоснования целесообразности использования предлагаемой методики ТСХ для разделения и определения витаминов А и Е провели сравнение ее характеристик с методиками, основанными на применении ВЭЖХ [3,8] (таблица 4).

Таким образом, в зависимости от целей анализа использование методики ТСХ, обладающей характеристиками, сопоставимыми с методом ВЭЖХ, в определенных условиях, более предпочтительно в виду низкой стоимости и экспрессности анализа. Однако, разработанная методика может быть рекомендована только для разделения и идентификации витаминов А и Е при совместном присутствии в тонком слое.



Рис. 6. Вид хроматограммы раствора содержащего 1 капсулы «Аевит» в 10 мл спирта (точка 1) и смеси стандартных образцов (0.5 мкл) ретинола ацетата и (0.5 мкл) токоферола ацетата (точка 2) в системе гексан-хлороформ (3:1).

Сравнительная характеристика методик определения витаминов А и Е

№ п/п	Характеристика методики	ВЭЖХ	Разработанная методика ТСХ
1	Идентификация веществ	+	+
2	Определение примесей	+	+
3	Количественное определение	+	-
4	Разделение витаминов при совместном присутствии	+	+
5	Чувствительность	$\approx 1 \cdot 10^{-6}$ г	$1 \cdot 10^{-7}$ г (витамин А); $1 \cdot 10^{-6}$ г (витамин Е)
6	Область применения	контроль качества индивидуальных субстанций, монокомпонентных лекарственных форм витаминов, комплексных поливитаминных препаратов, изделий косметологической промышленности	
7	Средняя стоимость оборудования	Высокая (до 2 млн. руб.)	Низкая (до 15 тыс. руб.)
8	Дополнительное оборудование	Возможна смена колонки в зависимости от объекта и целей анализа	Не требуется
9	Продолжительность 5 анализов	20-30 мин.	30-40 мин
10	Производительность	≈ 20 анализов в час	≈ 10 анализов в час
11	Смена разделяющей среды и растворителя	Более трудоемка и длительна, требует большого расхода растворителя	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате, разработана методика определения и разделения жирорастворимых витаминов А и Е методом ТСХ при совместном присутствии. Показана возможность теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического определения данных веществ в тонком слое. Методика может быть использована в контроле качества комплексных поливитаминных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Проект ОФС «Методы количественного определения витаминов». <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakoreynyh-statey> (дата обращения 15.04.2015 г).
2. Государственная фармакопея Российской Федерации XII изд. — Часть 1. — М.: Изд-во: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения, 2008. — 704 с.
3. Бородина, Е.В. Определение α -токоферола и эргокальциферола методом тонкослойной хроматографии / Е.В. Бородина, Т.А. Китаева, Е.Ф. Сафонова и др. // Журн. Аналитической химии. — 2007. — Т. 62. — № 11. — С. 1181-1185.
4. «Раствор Ретинола ацетата в масле 33000 МЕ в капсулах». ФС 42-7811-97.

5. «Витамин Е в капсулах». НД 42-7843-97.
6. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Кирхнер // М.: Мир, 1981. — С. 402-407.
7. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Т. 2 / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец — М.: Мир, — 1980 — С. 610.
8. Тринева, О.В. Разделение жирорастворимых витаминов D2 и Е при совместном присутствии методом ТСХ / О.В. Тринева, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2015. — Т.15. — Вып. 1. — С. 42-50.
9. Тринева, О.В. Выбор оптимальных параметров определения витамина А в тонком слое сорбента / О.В. Тринева, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин // Химико-фармацевтический журнал. — 2013. — Т. 47. — №10. — С. 54-56.
10. Чечета, О.В. Метод тонкослойной хроматографии в оценке степени чистоты масляных препаратов витамина А // О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин, Г.А. Оголь // Химико-фармацевтический журнал. — 2008. — Т. 42. — №12. — С. 47-49.
11. Пат. 2530620 Российская Федерация, С1 Способ определения жирорастворимых витаминов А, D2, Е и β -каротина при совместном присутствии методом тонкослойной

Тринеева О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И.

хроматографии / О.В. Тринеева, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин (РФ). — №2013117180/15; заявл. 30.07.2013 г; опубл. 10.10.2014 г, Бюл. №28. — 13 с.

12. Рудаков, О.Б. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / О.Б.

Voronezhskiy gosudarstvennyy universitet

Тринеева О. В., кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета

E-mail: trineevaov@mail.ru.

Сафонова Е. Ф., кандидат хим. наук, доцент, заведующая кафедрой фармации последипломного образования

E-mail: safonova@pharmvsu.ru

Сливкин А. И., доктор фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета

E-mail: slivkin@pharmvsu.ru

Рудаков, И.А. Востров, С.В. Федоров и др. — Воронеж: «Водолей», 2004. — 528 с.

13. Гейсс, Ф. Основы тонкослойной хроматографии / Ф.Гейсс — М.: Мир, 1999. — 405 с.

14. «Аевит в капсулах». ФС 42-1699-95.

Voronezh State University

Trineeva O. V., candidate of pharmaceutical sciences, associate professor of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty

E-mail: trineevaov@mail.ru.

Safonova E. F., the candidate chem. sciences, the senior lecturer, manager of chair of pharmacy of post-degree formation

E-mail: safonova@pharmvsu.ru

Slivkin A. I., doctor of pharmaceutical sciences, professor, manager chair of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, dean of pharmaceutical faculty

E-mail: slivkin@pharmvsu.ru