



УДК 541.183:542.81

## Закономерности сорбции жирорастворимых витаминов на сорбенте Strata Traditional C18-E

Рычкова С. А., Ланин С. Н., Шаталов И. А., Востров И. А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 2.04.2014 г.

### Аннотация

Исследована сорбция жирорастворимых витаминов (А, D<sub>3</sub> и Е) из растворов в смеси *i*-пропанол - вода на сорбенте Strata Traditional C18-E. Измерена динамическая емкость сорбента по отношению к каждому витамину. Определена степень десорбции жирорастворимых витаминов различными объемами изопропанола.

**Ключевые слова:** Твёрдофазная экстракция, обращено-фазовый сорбент, жирорастворимые витамины, витамины А, D<sub>3</sub>, Е, высокоэффективная жидкостная хроматография.

The processes of sorption fat-soluble vitamins (A, D<sub>3</sub>, and E) from solutions of *i*-propanol - water have been investigated on the sorbent Strata Traditional C18-E. Dynamic capacity of the sorbent has been measured with respect to each vitamin. The degree of desorption of fat-soluble vitamins by different volumes of *i*-propanol has been determined.

**Keywords:** Solid phase extraction, reversed-phase sorbent, fat-soluble vitamins, vitamins A, D<sub>3</sub>, E, high performance liquid chromatography

### Введение

Твердофазная экстракция (ТФЭ) в последние годы является наиболее эффективным методом для подготовки проб для анализа, извлечения, очистки и концентрирования веществ [1]. Наиболее часто используемыми сорбентами для проведения ТФЭ органических соединений являются обращенно-фазовые сорбенты типа С8 и С18 [2 - 5].

Анализ витаминов в растительных объектах и биологических жидкостях методом ВЭЖХ представляет весьма сложную задачу из-за наличия большого числа сопутствующих компонентов и, как следствие, перегруженности хроматографического профиля. [6].

Применение метода ТФЭ оказалось достаточно эффективным способом для очистки и концентрирования витаминов. Совместное использование методов ТФЭ и ВЭЖХ представляет собой эффективный инструмент для качественного и количественного анализа витаминов в клинических пробах и пищевых продуктах.

На сегодняшний день существуют аналитические методики по очистке и концентрированию витаминов. Однако физико-химические аспекты процесса остаются недостаточно изученными. Целью данной работы являлось изучение закономерностей и оптимизация сорбции жирорастворимых витаминов (ЖВ) в динамических условиях с использованием метода ТФЭ; изучение удерживания ЖВ и

оценка динамической емкости сорбента в зависимости от состава и объема растворителей, необходимых для сорбции и десорбции.

## Эксперимент

Хроматографическая система. Исследования проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (Япония) с двумя насосами, укомплектованном спектрофотометрическим детектором, стальной хроматографической колонкой Synergi Hydro-RP 150×2 мм (Phenomenex, США), предколонкой Security Guard Cartridges Silica 4×2,0 мм (Phenomenex, США).

Реактивы и растворители. Использовали ацетонитрил класса HPLC (Panreac), этанол 96% (Реахим), *изопропанол* класса HPLC (LiChrosolv), деионизованная вода (деионизатор Portlab D-301). Использовали стандартные образцы («Sigma», США) следующих витаминов: ретинол ацетат (А), холекальциферол (D<sub>3</sub>), токоферол ацетат (Е) (рис. 1).

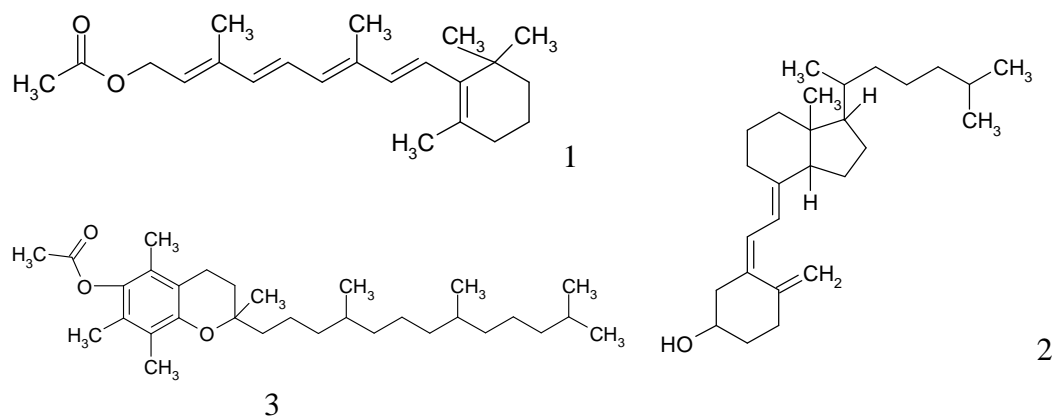


Рис. 1. Структуры жирорастворимых витаминов: 1 - ретинол ацетат; 2 - холекальциферол; 3 - токоферол ацетат

Методика ТФЭ. Для проведения твердофазной экстракции использовали коммерческие картриджи Strata Traditional C18-E (200 mg, Phenomenex, США). Индивидуальные растворы известной концентрации (модельные растворы) определяемых соединений (витаминов А, D<sub>3</sub>, Е) готовили с концентрацией ~ 2–5 мМ. Для этого навеску жирорастворимого витамина растворяли в *i*-пропанол. К растворенному витамину добавляли воду в таком количестве, чтобы объемный состав растворов *i*-пропанол - вода составлял 50:50, 40:60, 35:65, 30:70. Хроматографическим методом определяли содержание витамина в приготовленном растворе. Значения площадей хроматографических пиков использовали для последующего расчёта коэффициентов концентрирования витаминов. Кондиционировали картридж (концентрирующий патрон) Strata Traditional C18-E (200 mg) 3 мл раствора *i*-пропанол - вода в том объемном соотношении, при котором далее сорбировали витамин. Пропускали определенный объем приготовленного модельного раствора жирорастворимого витамина через слой сорбента со скоростью ~1.5 мл/мин. Элюировали адсорбированные витамины изопропиловым спиртом (0.25 мл, 0.5 мл, 0.75 мл и 1 мл).

## Обсуждение результатов

### Изучение адсорбции жирорастворимых витаминов на картридже Strata Traditional C18-E

Адсорбцию витаминов в динамических условиях измеряли путем пропускания порциями по 5-10 мл раствора каждого из трех витаминов через концентрирующий патрон Strata Traditional C18-E, отбирая при этом аликвоты по 1 мл. На основании определения концентрации витаминов ( $C_i$ ) хроматографическим методом строили зависимости относительной концентрации  $C_i/C_0$  от объема пропущенного раствора (динамические выходные кривые концентрирования) [7]. На основании полученных данных определяли объем до проскока витамина  $V_b$ , мл (объем, при котором текущая концентрация витамина в растворе достигает 50% от его концентрации в исходном растворе  $C_0$ ) и динамическую емкость ( $DE$ ) сорбента (площадь под динамической выходной кривой), моль/г [8].

$$DE = \frac{C_0 \cdot V_b}{m \cdot 1000}, \quad (1)$$

где  $C_0$  – концентрация витамина в исходном растворе, моль/л;  $V_b$  – объем проскока, мл;  $m$  – масса сухого сорбента, г.

На рис. 2 представлены динамические выходные кривые, полученные при концентрировании жирорастворимых витаминов (А, D<sub>3</sub>, Е) из модельных растворов с содержанием основных компонентов  $C_0 \sim 10^{-3}$  моль/л.

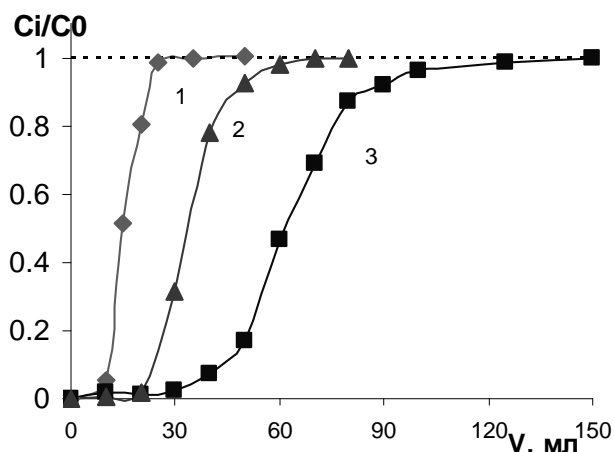


Рис. 2. Выходные динамические кривые жирорастворимых витаминов на концентрирующем патроне Strata Traditional C18-E: витамины сорбировали из раствора *i*-пропанол - вода в соотношении 50:50; 1 - ретинола ацетат, 2 – холекальциферол, 3 - токоферола ацетат; концентрации: 1 –  $2 \cdot 10^{-3}$ , 2 –  $4.9 \cdot 10^{-3}$ , 3 –  $8.4 \cdot 10^{-4}$  моль/л; скорость потока 1.5 мл/мин.

Из рис. 2 следует, что порядок выхода динамических кривых соответствует увеличению сорбции витаминов на поверхности сорбента вследствие увеличения фактора липофильности молекул в ряду ретинола ацетат ( $\log P = 5.00$ ) < холекальциферол ( $\log P = 6.88$ ) < токоферола ацетат ( $\log P = 9.38$ ). Корреляционное уравнение, связывающее физико-химический параметр (фактор липофильности) молекул сорбатов с их сорбционной характеристикой – фактором удерживания ( $k$ ), выражается следующим уравнением:

$$\ln k = 2.2443 \log P - 0.378 \quad (R^2 = 0.993)$$

По выходным динамическим кривым жирорастворимых витаминов были оценены объемы проскока ( $V_b$ ) и на основании уравнения 1 определена динамическая емкость сорбента Strata Traditional C18-E по отношению к каждому сорбату (табл. 1).

Таблица 1. Динамическая емкость сорбента Strata Traditional C18-E по отношению к ЖВ ( $t_R$  – время удерживания вещества, мин;  $F$  – объемная скорость ПФ, мл/мин;  $C_0$  – концентрация витамина в исходном растворе, моль/л;  $V_b$  – объем проскока (объем, при котором  $C_i/C_0=0.5$ ), мл;  $DE$  – динамическая емкость сорбента, моль/г)

Сорбат	$t_R$ , мин* ( $F=0,5$ мл/мин)	$C_0$ , моль/л	$V_b$ , мл ( $C_i/C_0=0,5$ )	$DE$ , моль/г
Ретинола ацетат	5.5	$2.0 \cdot 10^{-3}$	15	$15 \cdot 10^{-5}$
Холекальциферол	12.4	$4.9 \cdot 10^{-3}$	34	$83 \cdot 10^{-5}$
Токоферола ацетат	15.0	$8.4 \cdot 10^{-4}$	61.5	$25.7 \cdot 10^{-5}$

\* на колонке Synergi Fusion-RP (Phenomenex, США)

На рис. 3 представлены динамические выходные кривые, полученные при концентрировании ретинола ацетата на картридже Strata Traditional C18-E из раствора *i*-пропанол:  $H_2O$  (50:50) с содержанием витамина  $2 \cdot 10^{-3}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л.

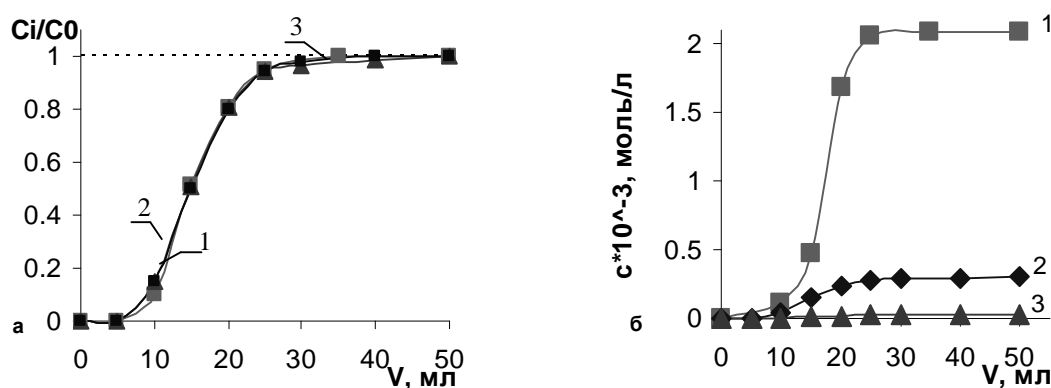


Рис. 3. Выходные динамические кривые ретинола ацетата на концентрирующем патроне Strata Traditional C18-E: витамин сорбировали из раствора *i*-пропанол - вода в соотношении 50:50; концентрации: 1 –  $2 \cdot 10^{-3}$ , 2 –  $3 \cdot 10^{-4}$ , 3 –  $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л; а – зависимость относительной концентрации от объема раствора, б – зависимость текущей концентрации от объема раствора

Из представленных данных (рис. 3 а) следует, что объем «проскока» остается постоянным ( $V_b \approx 15$  мл) независимо от концентрации раствора. При этом количество витамина, адсорбируемого на патроне, уменьшается пропорционально уменьшению концентрации сорбата в растворе (рис. 3 б). Постоянство объема «проскока» при изменении содержания витамина в растворе свидетельствует о линейной форме изотермы сорбции (в исследованном концентрационном интервале) жирорастворимых витаминов на сорбенте Strata Traditional C18-E.

Далее была оценена динамическая емкость сорбента по отношению к жирорастворимому витамину ретинолу ацетату ( $C_0 \approx 10^{-3}$  моль/л) при адсорбции данного сорбата из растворов *i*-пропанол - вода в соотношении 50:50, 40:60, 35:65 и 30:70 (рис. 4).

Зависимость изменения динамической емкости сорбента от соотношения *i*-пропанол :  $H_2O$  в растворе, из которого сорбируется ретинол ацетат, показана в табл. 2.

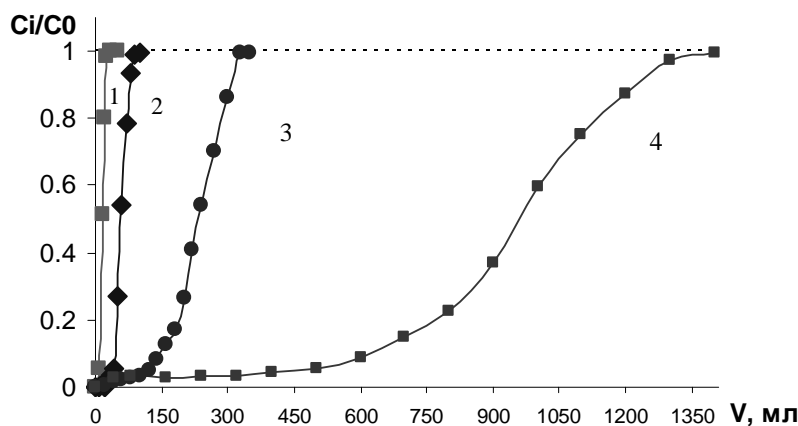


Рис. 4. Выходные динамические кривые ретинола ацетата на концентрирующем патроне Strata Traditional C18-E: витамин наносится из раствора *i*-пропанол - вода в соотношении 1 – 50:50, 2 – 40:60, 3 – 35:65, 4 – 30:70; концентрации  $C_0$ : 1 –  $2 \cdot 10^{-3}$ , 2 –  $1.9 \cdot 10^{-3}$ , 3 –  $2.6 \cdot 10^{-3}$ , 4 –  $2.1 \cdot 10^{-3}$  моль/л

Таблица 2. Динамическая емкость сорбента Strata Traditional C18-E по отношению к ретинолу ацетату в зависимости от объемного состава растворителя.

<i>i</i> -пропанол - вода ( <i>v/v</i> )	$C_0$ , моль/л	$V_b$ , мл ( $C_i/C_0=0,5$ )	$DE \cdot 10^{-5}$ , моль/г
50:50	$2.0 \cdot 10^{-3}$	15	15
40:60	$1.9 \cdot 10^{-3}$	59	56
35:65	$2.6 \cdot 10^{-3}$	235	306
30:70	$2.1 \cdot 10^{-3}$	947	994

Из полученных данных следует, что при увеличении объемной доли воды в растворе «проскок» сорбатов наблюдается при большем объеме пропущенного модельного раствора, что связано с увеличением удерживания (сорбции) витамина на поверхности сорбента из-за уменьшения элюирующей силы растворителя. Одновременно с увеличением объема «проскока» происходит и размывание фронтов динамических выходных кривых. Из данных табл. 2 следует, что уменьшение объемной доли органического растворителя приводит к увеличению значения динамической емкости сорбента. Тем не менее, исследование сорбции жирорастворимых витаминов из растворов с большим содержанием  $H_2O$  затруднительно из-за сильного размывания начала и конца фронта выходной динамической кривой, как в случае сорбции витамина ретинола ацетата из раствора *i*-пропанол :  $H_2O$  в соотношении 30:70 (рис. 4). Аналогичная тенденция изменения динамической сорбции наблюдается и в случае других жирорастворимых витаминов (табл. 3).

Однако, использование растворов *i*-пропанол - вода с большим содержанием воды (больше 60 % об. в случае витаминов  $D_3$  и  $E$ , и больше 80 об. % в случае витамина  $A$ ) затруднено вследствие низкой растворимости гидрофобных витаминов в полярной фазе. Это приводит к уменьшению величины динамической емкости сорбента, рассчитанной по уравнению 1 (табл. 3) и, как следствие, к смещению выходной динамической кривой к оси ординат

Таблица 3. Динамическая емкость сорбента Strata Traditional C18-E по отношению к ЖВ в зависимости от объемного состава растворителя

Витамин	<i>i</i> -пропанол - вода (v/v)	$C_0$ , моль/л	$V_b$ , мл ( $C_i/C_0=0,5$ )	$DE \cdot 10^{-5}$ , моль/г
Холекальциферол	50:50	$4.9 \cdot 10^{-3}$	34	83
	40:60	$4.8 \cdot 10^{-3}$	128	309
	35:65	$2.0 \cdot 10^{-3}$	235	214
	30:70	$1.2 \cdot 10^{-3}$	287	179
Токоферола ацетат	50:50	$8.4 \cdot 10^{-4}$	61.5	25.7
	40:60	$7.9 \cdot 10^{-4}$	135	53.7
	35:65	$5.0 \cdot 10^{-4}$	50	12
	30:70	$3.0 \cdot 10^{-4}$	65	10

#### Изучение десорбции жирорастворимых витаминов с сорбента Strata Traditional C18-E

На рис. 5 представлены хроматограммы холекальциферола, соответствующие исходным концентрациям витамина  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Видно, что при концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  происходит приближение интенсивности хроматографического пика к порогу чувствительности детектора.

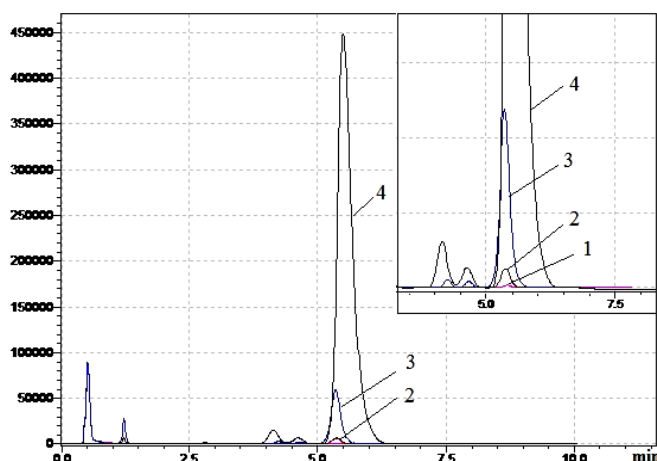


Рис. 5. Хроматограммы, соответствующие исходному количеству витамина  $D_3$  в модельном растворе с концентрациями  $1 \cdot 10^{-5}$  (1),  $5 \cdot 10^{-5}$  (2),  $4 \cdot 10^{-4}$  (3),  $5 \cdot 10^{-3}$  (4) моль/л, соответственно

Исходный модельный раствор витамина  $D_3$  с концентрацией  $C_0=1 \cdot 10^{-5}$  моль/л (соотношение *i*-пропанол - вода в растворе, из которого сорбировали витамин, составило 50:50) пропускали через концентрирующий патрон Strata Traditional C18-E до момента «проскока» ( $V_b = 15$  мл). Десорбцию с сорбента, насыщенного витамином, проводили 0.25 мл, 0.5 мл, 0.75 мл и 1 мл *i*-пропанола, соответственно (рис. 6).

Из сравнения площадей пиков видно, что наибольшая концентрация витамина в растворе достигается при его десорбции 0,5 мл *i*-пропанола. Использование меньшего объема элюирующего растворителя (0,25 мл) оказывается недостаточным для проведения полной десорбции витамина, в то время как использование большего объема *i*-пропанола приводит к разбавлению пробы и уменьшению концентрации сорбата. Следовательно, для данного процесса оптимальный объем элюирующего

растворителя соответствует 0,5 мл. Аналогичная тенденция наблюдается и в случае других жирорастворимых витаминов (рис. 7 а).

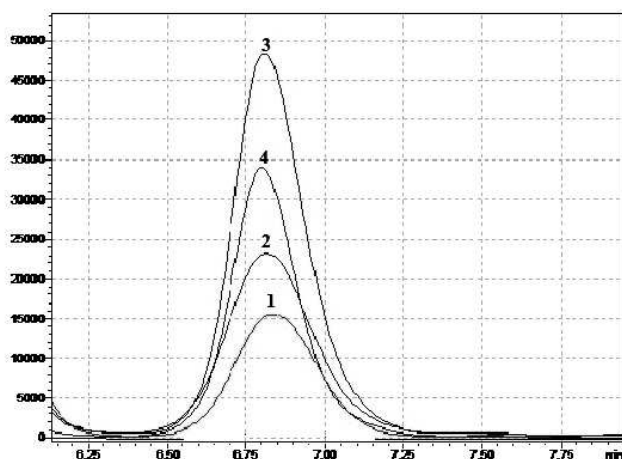


Рис. 6. Хроматограммы, соответствующие количеству десорбированного витамина Д<sub>3</sub> с сорбента Strata Traditional C18-E: 1 - 1 мл, 2 - 0,75 мл, 3 - 0,5 мл и 4 - 0,25 мл *i*-пропанола, соответственно

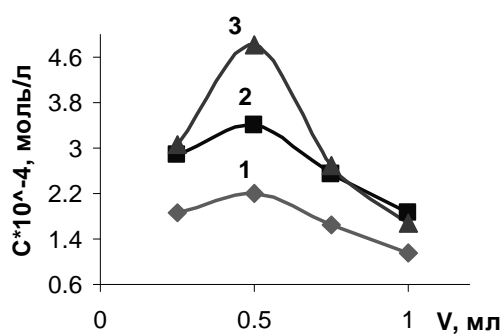


Рис. 7 а. Зависимость концентрации десорбированных жирорастворимых витаминов от объема *i*-пропанола, использованного для десорбции витаминов с патрона Strata Traditional C18-E (витамины адсорбировали на патроне из раствора *i*-пропанол : H<sub>2</sub>O в соотношении 50:50): 1 – токоферола ацетат; 2 – ретинола ацетат; 3 – холекальциферол.

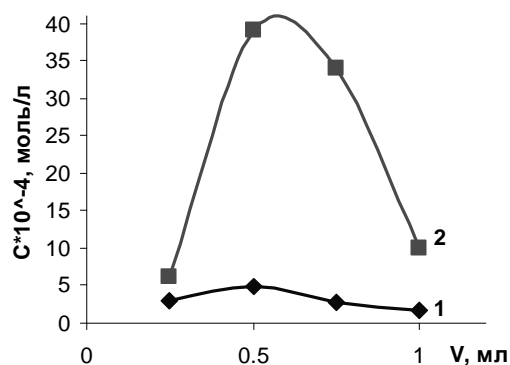


Рис. 7 б. Зависимость концентрации десорбированного холекальциферола от объема *i*-пропанола, использованного для десорбции с патрона Strata Traditional C18-E: D<sub>3</sub> адсорбировали из раствора *i*-пропанол : H<sub>2</sub>O в соотношении 50:50 и 40:60; 1 – 50:50, 2 – 40:60.

Методы концентрирования характеризуются коэффициентом концентрирования  $K$ , который служит критерием при выборе метода концентрирования:

$$K = \frac{q_{\text{микро}}}{q_{\text{осн}}} \bigg/ \frac{q'_{\text{микро}}}{q'_{\text{осн}}}, \quad (2)$$

где  $q_{\text{микро}}$  и  $q'_{\text{микро}}$  – количество микрокомпонента до и после концентрирования (т.е. в исходной пробе и в концентрате соответственно);  $q_{\text{осн}}$  и  $q'_{\text{осн}}$  – количество основного компонента до и после концентрирования [9].

В табл. 4 представлены коэффициенты концентрирования ЖВ при использовании для десорбции 0.25, 0.5, 0.75 и 1 мл *i*-пропанола соответственно. Сорбцию витаминов на концентрирующий патрон Strata Traditional C18-E проводили из раствора *i*-пропанол : H<sub>2</sub>O в соотношении 50:50.

Таблица 4. Коэффициенты концентрирования жирорастворимых витаминов на сорбенте Strata Traditional C18-E в зависимости от объема *i*-пропанола, использованного для проведения десорбции

Витамин	C <sub>0</sub> , моль/л	V <sub>десорб</sub> , мл	C <sub>десорб</sub> , моль/л	K
Ретинола ацетат	1.6*10 <sup>-5</sup>	1	2.1·10 <sup>-4</sup>	13.1
		0.75	2.5·10 <sup>-4</sup>	15.9
		0.5	3.4·10 <sup>-4</sup>	21.1
		0.25	2.9·10 <sup>-4</sup>	17.9
Холекальциферол	1.5*10 <sup>-5</sup>	1	1.7·10 <sup>-4</sup>	11.4
		0.75	2.7·10 <sup>-4</sup>	18.3
		0.5	4.8·10 <sup>-4</sup>	32.8
		0.25	3.1·10 <sup>-4</sup>	20.7
Токоферола ацетат	1.0*10 <sup>-5</sup>	1	1.1·10 <sup>-4</sup>	11.3
		0.75	1.8·10 <sup>-4</sup>	18.2
		0.5	2.4·10	24.4
		0.25	1.9·10	18.8

На рис. 7 б представлены кривые десорбции витамина ретинола ацетата, адсорбированного на концентрирующем патроне из модельных растворов с различным объемным соотношением *i*-пропанол - вода. Выше было показано, что при увеличении доли воды в растворе динамическая емкость сорбента возрастает. При сорбции ретинола ацетата из раствора *i*-пропанол - вода в соотношении 40:60 и последующей десорбции сорбата 0,5 мл *i*-пропанола удалось сконцентрировать витамин в ~100 раз.

Таким образом, варьируя состав растворителя, из которого сорбируется вещество, и используя для десорбции минимальный оптимальный объем элюирующего раствора, можно существенно увеличить степень концентрирования анализируемого компонента.

## Заключение

Изучены физико-химические закономерности сорбции жирорастворимых витаминов из водно-изопропанольных растворов методом твердофазной экстракции на концентрирующем патроне Strata Traditional C18-E. Из динамических выходных кривых оценена динамическая емкость сорбента по отношению к каждому витамину.

Показано, что при увеличении объемной доли воды в растворе *i*-пропанол - вода «проскок» сорбатов наблюдается при большем объеме пропущенного модельного раствора. Однако вследствие низкой растворимости сорбатов в подвижных фазах с большим содержанием воды использование таких подвижных фаз затруднено.

Уменьшая элюирующую силу растворителя, из которого адсорбируется вещество, и используя минимальный оптимальный объем раствора для проведения



десорбции, можно существенно (более чем в 100 раз) увеличить степень концентрирования анализируемого компонента.

### Список литературы

1. Luque-García J. L., Luque de Castro M. D. Extraction of fat-soluble vitamins. Review // J. Chromatogr. A. 2001. V. 935. P. 3-11.
2. Xiuping Xue, Jinming You, and Pingli He. Simultaneous determination of five fat-soluble vitamins in feed by high-performance liquid chromatography following solid-phase extraction // J. Chromatogr. Sci. 2008. V. 46. P. 345-350.
3. Jedlička A., Klimeš J. Determination of water- and fat-soluble vitamins in different matrices using high-performance liquid chromatography // Chem. Pap. 2005. V. 59. P. 202-222.
4. Gatti R., Gioia M.G., Cavrini V. Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescence detection // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000. V. 23. P. 147-159.
5. Moreno P., Salvadó V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2000. V. 870. P. 207-215.
6. Руденко А.О., Карцова Л.А., Даванков В.А. Выявление возможностей сорбента Purosep-200 на основе сверхсшитого полистирола при анализе водо- и жирорастворимых витаминов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. Вып. 6. С. 766-773.
7. Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н., Фадеева В.И. и др. Основы аналитической химии. В 2 кн. Кн. 1. Общие вопросы. Методы разделения: Учебник для вузов. М.: Высш. шк. 2004. 361 с.
8. Сычев К.С., Даванков В.А. Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка // Сорбционные и хроматографические процессы. 2004. Т.4. Вып.1. С. 5-28.
9. Посыпайко В.И., Козырева Н.А., Логачева Ю.П. Химические методы анализа: Учеб. пособие для хим.-технол. Вузов. М.: Высш. шк. 1989. 448 с.

**Рычкова Светлана Александровна** – аспирант кафедры физической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

**Ланин Сергей Николаевич** – д.х.н., проф., зав. лабораторией адсорбции и хроматографии кафедры физической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва.

**Шаталов Игорь Алексеевич** – директор ЗАО “Портлаб”, Москва

**Востров Иван Александрович** – инженер, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва.

**Rychkova Svetlana A.** – post-graduate student of department of Physical Chemistry, Moscow State University, Moscow, e-mail: [svetlanrychkov@yandex.ru](mailto:svetlanrychkov@yandex.ru)

**Lanin Sergey N.** – Dr.Sc.Chem., professor, Head of the laboratory of adsorption and chromatography Moscow State University, Moscow, e-mail: [snlanin@phys.chem.msu.ru](mailto:snlanin@phys.chem.msu.ru)

**Shatalov Igor A.** – Head of JSC “Portlab”, Moscow

**Vostrov Ivan A.** – engineer, Moscow State University, Moscow