



УДК 543.544.943.3.068.9

Разделение жирорастворимых витаминов D₂ и E при совместном присутствии методом ТСХ

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

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 19.09.2014 г.

Разработана методика определения и разделения жирорастворимых витаминов D₂ и E методом ТСХ при совместном присутствии. Показана возможность теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения данных веществ в тонком слое. Методика может быть использована в контроле качества растительных масел и масляных экстрактов фармацевтического назначения, а также комплексных поливитаминных препаратов.

Ключевые слова: токоферола ацетат, эргокальциферол, тонкослойная хроматография, жирные растительные масла.

Separation of fat-soluble vitamins D₂ and E at the joint presence of TLC

Trineeva O.V., Safonova E.F., Slivkin A.I.

Voronezh State University, Voronezh

The work is dedicated to the development of methods for determining and division of fat-soluble vitamins D₂ and E by the method of TLC when present together. A study of the different elution systems, constructed according to R_f values tocopherol acetate and ergocalciferol polarity eluent value intervals defined polarity eluent in which the data are linear function. Based on the identified dependencies, the possibility of a theoretical approach to the selection of the optimal conditions of chromatographic separation of these substances in a thin layer at the joint presence. The developed method was tested on vegetable oil sea buckthorn fruit. The technique can be used in the quality control of vegetable oils and oil extracts of pharmaceutical and complex multivitamin preparations.

Keywords: tocopherol acetate, ergocalciferol, thin layer chromatography, fatty oils.

Введение

Витамины D (кальциферолы) объединяют группу родственных соединений, обладающих антирахитической активностью. Важнейший среди них – эргокальциферол (витамин D₂) (рис. 1). Витамин E, выпускаемый фармацевтической промышленностью в виде токоферола ацетата является природным антиоксидантом, который предотвращают окисление ненасыщенных липидов, предохраняет от разрушения клеточные мембраны и вследствие этого широко применяется для профилактики и лечения ряда заболеваний.

Анализ литературы за последние 10 лет показал, что при контроле качества многокомпонентных препаратов, содержащих жирорастворимые витамины (ЖРВ) группы D и E (рис. 1), предпочтение отдается физико-химическим методам, как наиболее экспрессным, чувствительным и информативным. Более объективный качественный и количественный анализ позволяют получить хроматографические методы, из которых наибольшее распространение получили тонкослойная хроматография (ТСХ) [1-3] и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [4-9]. ВЭЖХ – наиболее быстрый и точный метод анализа ЖРВ [4-9]. Однако следует отметить, что высокая стоимость оборудования и нехватка квалифицированных кадров существенно ограничивает практическое использование метода ВЭЖХ [4-9]. ТСХ является важным методом разделения ЖРВ и стероидов, часто отсутствующих им в природных источниках и лекарственных препаратах.

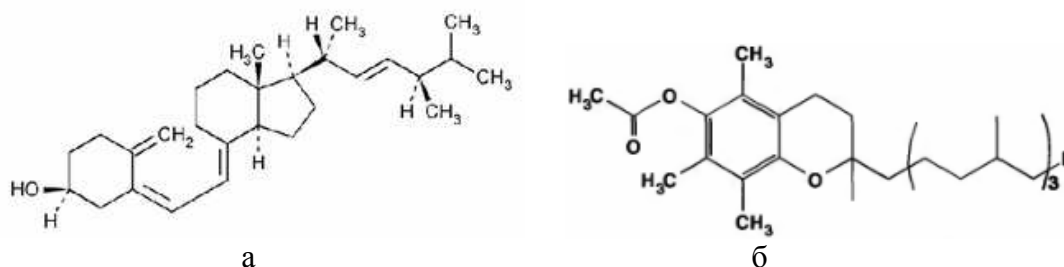


Рис. 1. Структурные формулы эргокальциферола (а) и токоферола ацетата (б)

Цель работы - изучение различных элюирующих систем и оптимальных условий хроматографирования, позволяющих провести разделение и определение витаминов D₂ и E методом ТСХ при совместном присутствии.

Эксперимент

Выбор проявителя осуществляли с учетом таких требований как специфичность, высокая чувствительность, доступность и высокое качество получаемой картины (табл. 1).

Таблица 1. Детектирующие реагенты для определения ЖРВ методом ТСХ

№ п/п	Реагент	Витамин E	Витамин D ₂
1	Конц. азотная кислота	Оранжево-красные зоны на белом фоне	-
2	Хлорид сурьмы (III)	-	Розовые зоны на белом фоне
3	Конц. хлорная кислота	-	Оранжево-коричневые зоны на белом фоне
4	5% спиртовой ФМК	Темно-синие зоны на желто-зеленом фоне	

Для обнаружения пятен эргокальциферола (ФСП 42-0008018000) [6] и токоферола ацетата (ФС 42-7843-97) [4], которые выбраны в качестве стандартов для разработки методики, были использованы реагенты, предложенные в литературе [1-3,10-12]: конц. азотная кислота; 70 % раствор хлорной кислоты, хлорид сурьмы (III) и 5% спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты (ФМК). В результате установлено, что первый проявитель обнаруживает только хроматографические зоны витамина E (красно-оранжевого цвета на белом фоне), второй – только зоны

эргокальциферола (размытые оранжево-красные зоны на белом фоне), третий – только зоны эргокальциферола (розовые зоны на белом фоне). ФМК – проявляет оба витамина (темно-синие зоны на желто-зеленом фоне). Детектирующим реагентом, отвечающим всем требованиям, является 5% спиртовый раствор ФМК, так как, по нашим данным, предел обнаружения с его помощью составил $7 \cdot 10^{-9}$ г (0.2 мкл раствора с содержанием 0.035 мг/мл) для витамина D₂ и $1 \cdot 10^{-6}$ г (0.1 мкл раствора с содержанием 10 мг/мл) для витамина E, 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 [4-9].

Обсуждение результатов

Для обоснования возможности использования теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения эргокальциферола и токоферола ацетата 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).

Таблица 2. Параметры хроматографического разделения смеси стандартных образцов витаминов D₂ и E

№ п/п	Состав элюента	R ⁰	Величина R _f		K		L
			D ₂	E	D ₂	E	
1	Гексан	0	0.025±0.002	0.01±0.001	39	99	0.4
2	Гексан-бензол (29:1)	0.15	0.03±0.003	0.02±0.001	32.3	49	0.66
3	Гексан-бензол (19:1)	0.22	0.03±0.003	0.02±0.001	32.3	49	0.66
4	Гексан-бензол (14:1)	0.29	0.03±0.003	0.08±0.001	32.3	11.5	2.8
5	Гексан-хлороформ (10:1)	0.4	0.04±0.002	0.07±0.001	24	13.3	1.8
6	Гексан-хлороформ (5:1)	0.73	0.27±0.02	0.46±0.002	2.70	1.17	2.31
7	Гексан-хлороформ (4:1)	0.88	0.35±0.01	0.52±0.001	1.86	0.92	2.02
8	Гексан-хлороформ (3:1)	1.1	0.67±0.03	0.76±0.002	0.49	0.29	1.69
9	Гексан-хлороформ (2:1)	1.47	0.85±0.01	0.92±0.001	0.18	0.087	2.03
10	Гексан-хлороформ (1:1)	2.2	0.93±0.01	0.95±0.001	0.075	0.053	1.42
11	Хлороформ	4.4	0.99±0.01	0.98±0.001	0.01	0.02	0.5

Исследовали системы, предложенные в литературе, а также апробированы новые хроматографические системы. Для каждой элюирующей системы рассчитаны полярность (R⁰) [13], а также такие хроматографические параметры витаминов D₂ и E, как величина относительной скорости перемещения (R_f), коэффициент распределения (K) и показатель селективности сорбции (L).

Оптимальные величины R_f, согласно автору [14], и лучшее качество хроматографических зон было достигнуто в системах № 6-8 (табл. 2). Вид хроматограмм спиртового раствора смеси стандартных образцов эргокальциферола и токоферола ацетата (1 мкл) в системах гексан-хлороформ (3:1), (4:1) и (5:1) приведены на рис. 2.

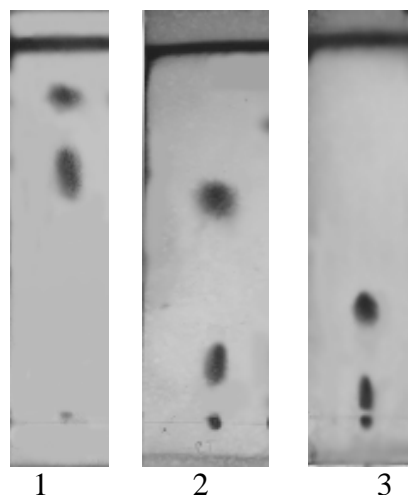


Рис. 2. Вид хроматограмм спиртового раствора смеси стандартных образцов эргокальциферола и токоферола ацетата (1 мкл) в системах гексан-хлороформ (3:1) – точка 1; гексан-хлороформ (4:1) – точка 2 и гексан-хлороформ (5:1) – точка 3.

При варьировании соотношением гексана и хлороформа в двухкомпонентной подвижной фазе, были получены кривые зависимости величины относительной скорости перемещения веществ от процентного содержания каждого компонента в элюенте (рис. 3 а и б). Полученные зависимости позволили установить, что для достижения оптимальной величины R_f содержание гексана и хлороформа в системе должно быть в определенном соотношении по объему (табл. 3).

Таблица 3. Оптимальное соотношение гексана и хлороформа в двухкомпонентной подвижной фазе при определении ЖРВ методом ТСХ

№п/п	ЖРВ	Содержание компонентов, % (по объему)	
		Гексан	хлороформ
1	Витамин Е	75-85	15-25
2	Витамин D ₂	75-77	23-25

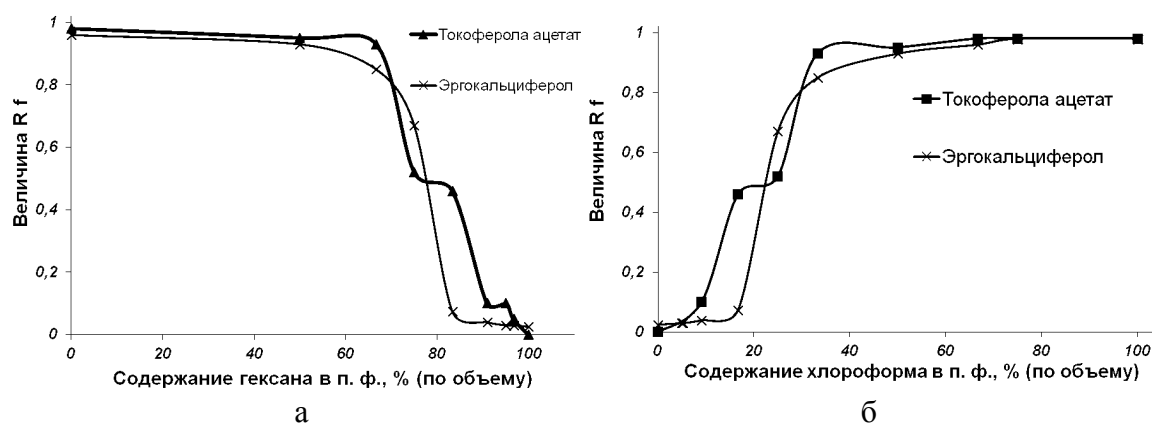


Рис. 3. Зависимость относительной скорости перемещения ЖРВ от содержания гексана (а) и хлороформа (б) в подвижной фазе (неподвижная фаза – силикагель).

По полученным данным построена кривая зависимости величины R_f витаминов D₂ и Е (рис. 4) от полярности системы (P') в изучаемом интервале от 0 до 4.4 ед. полярности.

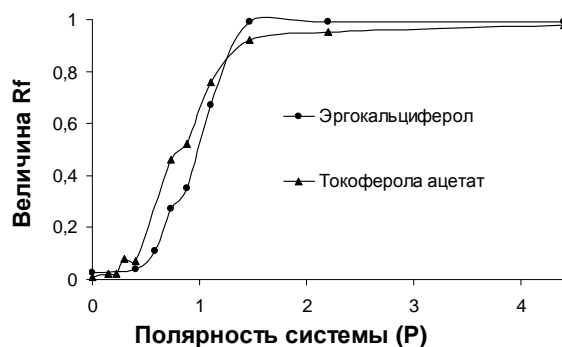


Рис. 4. Вид зависимости величины R_f токоферола ацетата и эргокальциферола от полярности элюента

Как видно из графика на рис. 4, в интервале полярностей от 0 до 0.5 ед. витамины на хроматограмме разделяться не будут (значения R_f близкие по величине). При достижении величины $P=1.5$ ед. и более, значение параметра R_f определяемых веществ перестает зависеть от полярности элюента, и компоненты не сорбируются неподвижной фазой ($R_f \rightarrow 1$). Следовательно, для достижения наилучшего разделения необходимо работать в узком диапазоне от 0.5 до 1.1 ед. полярности.

При более детальном изучении влияния полярности системы на величину R_f в диапазоне от 0.4 до 1.5 ед., были выбраны интервалы значений P элюента от 0.58 до 1.47 ед. (для эргокальциферола) и от 0.4 до 1.1 ед. (для токоферола ацетата), в которых данные зависимости становятся линейными (рис. 5).

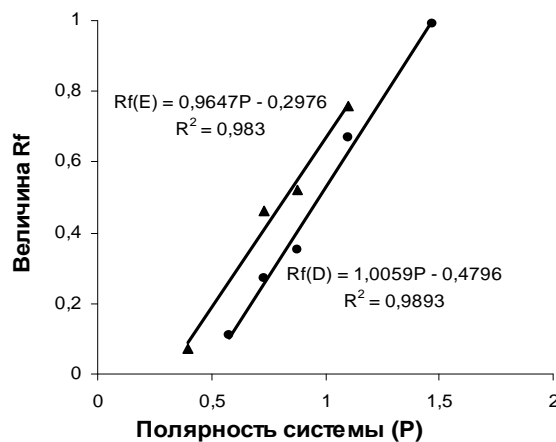


Рис. 5. Линейные зависимости величины R_f от значения полярности элюента

Проведена статистическая оценка параметров линейных зависимостей путем расчета величины коэффициента корреляции (R^2) [11]. Уравнения приведены на рис. 5. С помощью предложенной зависимости можно подбирать различные системы для разделения и определения витаминов D_2 и E при совместном присутствии в тонком слое сорбента, чтобы величина R_f укладывалась в оптимальные значения [14]. Таким образом, интервалы полярностей элюента могут варьировать от 0.62 до 0.93 (для токоферола ацетата) и от 0.76 до 1.07 ед. (для эргокальциферола). При совместном определении для достижения оптимальных величин R_f и наилучшего разделения следует работать в интервале от 0.73 до 0.93 ед.

При анализе значений селективности сорбции (табл. 2), установлено, что наилучшее разделение хроматографических зон достигается также в системах № 6 и 7 (интервал полярностей 0.73-0.88). Однако наилучшее значение данного показателя,

величин R_f и формы хроматографических зон разделяемых веществ были достигнуты в системе № 6.

В результате, по совокупности полученных данных, выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия хроматографического разделения и определения эргокальциферола и токоферола ацетата в тонком слое: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» 10×10 см с полимерной подложкой; элюент – гексан-хлороформ (5:1); проявитель – 5 % спиртовый раствор ФМК; оптимальный объем пробы – по 0.5 мкл спиртовых растворов с содержанием витамина D_2 0.035 мг/мл и витамина Е 10 мг/мл; время насыщения камеры парами элюента – 20 мин; время элюирования – 25 мин; время выдерживания пластинки в термостате при $t \geq 80^\circ\text{C}$ – 5-7 мин.

Разработанная методика разделения и определения витаминов D_2 и Е была апробирована на растительном масле плодов облепихи отечественного производителя, богатом токоферолами, каротиноидами и фитостеринами. Выделение ЖРВ из исследуемого масла осуществляли методом реперколяции с применением в качестве экстрагента 96% этанола, который обладает хорошей растворяющей способностью для изучаемых ЖРВ. При комнатной температуре растворимость масла в этаноле пренебрежимо мала. Это позволяет экстрагировать ЖРВ этанолом непосредственно из масла, без предварительного разделения его на фракции омыляемых и неомыляемых липидов. При этом максимально используется растворяющая способность экстрагента, так как слабые вытяжки имеют ее запас и могут извлекать действующие вещества из необработанного материала. Метод реперколяции позволяет получить концентрированные вытяжки без последующего упаривания. Вид хроматограммы 3 мкл спиртового извлечения из облепихового масла в системе гексан-хлороформ (5:1) представлен на рис. 6.



Рис. 6. Вид хроматограммы (1 – 1 мкл спиртового раствора смеси стандартных образцов эргокальциферола и токоферола ацетата; 2 – 3 мкл спиртового извлечения из облепихового масла) в системе гексан-хлороформ (5:1)

На треке спиртового извлечения из облепихового масла (рис. 6, точка 2) кроме зон эргокальциферола и токоферола, идентифицированных в сравнении со стандартными образцами, обнаружена дополнительная зона, характерная для β -каротина в данной элюирующей системе [15]. Результаты свидетельствуют об удовлетворительном разделении хроматографических зон на хроматограмме (т.е. критерием эффективного разделения является величина $L > 1$) и правомочности использования данной методики. Параметры хроматографического разделения приведены в табл. 4.

Таблица 4. Параметры хроматографического разделения витаминов D₂, E и β-каротина в препарате «Облепиховое масло»

№ п/п	Параметр хроматографического разделения	D ₂	E	β-каротин
1	Величина R _f	0.26±0.02	0.45±0.02	0,80±0,02
2	Коэффициент распределения (K)	2.85	1.22	0,25
3	Селективность сорбции (L)	2.34		4.88

Для обоснования целесообразности использования предлагаемой методики ТСХ для разделения и идентификации ЖРВ D₂ и E провели сравнение ее характеристик с методиками, основанными на применении ВЭЖХ [5,7-9,16] (таблица 5).

Таблица 5. Сравнительная характеристика методик определения ЖРВ D₂ и E [5,7-9,16]

№ п/п	Характеристика методики	ВЭЖХ	Разработанная методика ТСХ
1	Идентификация веществ	+	+
2	Определение примесей	+	+
3	Количественное определение	+	-
4	Разделение ЖРВ при совместном присутствии	+	+
5	Чувствительность	≈1·10 ⁻⁶ г	7·10 ⁻⁹ г (витамин D ₂); 1·10 ⁻⁶ г (витамин E)
6	Область применения	контроль качества растительных масел, масляных экстрактов, индивидуальных субстанций, монокомпонентных лекарственных форм на основе ЖРВ, комплексных поливитаминных препаратов (фармацевтическая и пищевая промышленности), 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 анализируемого объекта	Не требуется (может быть использовано и для анализа других веществ методом ТСХ)
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	легкость смены разделяющей среды и растворителя; небольшой расход растворителя (20-50 мл), продолжительность – 5 мин.

Разработанная методика может быть рекомендована только для разделения и идентификации витаминов D₂ и E при совместном присутствии и обладает характеристиками, сопоставимыми с методом ВЭЖХ. Однако, в зависимости от

целей анализа, использование методики ТСХ более предпочтительно в виду низкой стоимости и экспрессности анализа.

Заключение

Таким образом, разработана методика определения и разделения ЖРВ D₂ и E методом ТСХ при совместном присутствии. Показана возможность теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения данных веществ в тонком слое, т.е. возможность прогнозирования значения величин R_f исследуемых витаминов по уравнениям линейных зависимостей при известном значении полярности элюента. При совместном определении для достижения оптимальных величин R_f и наилучшего разделения следует работать в интервале от 0.73 до 0.93 ед. полярности системы. Методика может быть использована в контроле качества растительных масел и масляных экстрактов фармацевтического назначения, а также для разделения и идентификации витаминов D₂ и E в составе комплексных поливитаминных препаратов.

Список литературы:

1. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю. М. Островского. Минск.: «Наука и техника». 1979. С. 80-129.
2. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография М.: «Мир», 1981. С. 402-407.
3. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии М.: «Мир», 1980. Т. 2. 610 с.
4. НД 42-7843-97. «Витамин E в капсулах».
5. Лутцева А.И., Маслов Л.Г., Середенко В.И. Методы контроля и стандартизации лекарственных препаратов, содержащих жирорастворимые витамины // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35. № 10. С. 41-45.
6. ФСП 42-0008018000. «Эргокальциферол раствор в масле 0,5 %».
7. Козлов Э. И., Солунина И.А., Любарева М. Л. и др. Определение витаминов А, D, E в поливитаминных препаратах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии // Хим.-фарм. журн. 2003. Т. 37. № 10. С. 50-53.
8. Ключев С.А. Определение витаминов А и E методом ВЭЖХ с предварительным равновесным распределением в двух несмешивающихся жидких фаза // Журн. аналит. химии. 1996. Т. 51. № 9. С. 961-963.
9. Денисова Л.В., Филимонов В.Н., Балятинская Л.Н. и др. Хроматографическое поведение жирорастворимых витаминов в режиме обращенной-фазовой жидкостной хроматографии с подвижной фазой вода – изопропанол // Журн. аналит. химии. 1997. Т. 52. № 9. С. 967-969.
10. Государственная фармакопея X изд. // М.: Медицина, 1968. С. 627-628; 707-708.
11. Государственная фармакопея XI изд. // М.: Медицина, 1990. Вып. 2. . С. 41-59.
12. Государственная фармакопея Российской Федерации XII изд. – Часть 1. М.: Изд-во: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения. 2008. 704 с.
13. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии, Воронеж: Изд-во «Водолей». 2004. 528 с.
14. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М.: Мир, 1999. 405 с.
15. Чечета О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. Изучение хроматографических характеристик β-каротина в тонком слое сорбента // Хим.-фарм. журн. 2012. Т. 46. №5. С. 54-56.
16. Бородина Е.В., Китаева Т.А., Сафонова Е.Ф. и др. Определение α-токоферола и эргокальциферола методом тонкослойной хроматографии // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 11. С. 1181-1185.

References

1. Eksperimental'naya vitaminologiya, Pod red. Yu. M. Ostrovskogo, Minsk.: «Nauka i tekhnika», 1979, pp. 80-129.
2. Kirchner Yu. Tonkosloinaya khromatografiya, M.: «Mir», 1981, pp. 402-407.
3. Sharshunova M., Shvarts V., Mikhalets Ch. Tonkosloinaya khromatografiya v farmatsii i klinicheskoi biokhimmii, M.: «Mir», 1980, V. 2, 610 p.
4. ND 42-7843-97. «Vitamin E v kapsulakh»
5. Luttseva A.I., Maslov L.G., Seredenko V.I. Metody kontrolya i standartizatsii lekarstvennykh preparatov, sodержashchikh zhirorastvorimye vitamin [Methods of control and standardization of medicinal products containing fat-soluble vitamins], Pharmaceutical Chemistry Journal, 2001, V. 35, No. 10, pp. 41-45.
6. FSP 42-0008018000 «Ergokal'tsiferol rastvor v masle 0,5 %».
7. Kozlov E. I., Solunina I.A., Lyubareva M. L. et al. Opredelenie vitaminov A, D, E v polivitaminnykh preparatakh s pomoshch'yu vysokoeffektivnoi zhidkostnoi khromatografii [Determination of vitamins A, D, E in multivitamin preparations using HPLC], Pharmaceutical Chemistry Journal, 2003, V. 37, No 10, pp. 50-53.
8. Klyuev S.A. Opredelenie vitaminov A i E metodom VEZhKh s predvaritel'nym ravnovesnym raspredeleniem v dvukh neshivayushchikhsya zhidkikh faza [Determination of vitamins A and E by HPLC with pre-equilibrium distribution in two immiscible liquid phase], Journal of Analytical Chemistry, 1996, V. 51, No 9, pp. 961-963.
9. Denisova L.V., Filimonov V.N., Balyatinskaya L.N. et al. Khromatograficheskoe povedenie zhirorastvorimyykh vitaminov v rezhime obrashchennoi-fazovoi zhidkostnoi khromatografii s podvizhnoi fazoi voda – izopropanol [Chromatographic behavior of fat-soluble vitamins in the mode of reverse phase liquid chromatography under the vision-phase water – isopropanol], Journal of Analytical Chemistry, 1997, V. 52, No 9, pp. 967-969.
10. Gosudarstvennaya farmakopeya X izd., M.: Meditsina, 1968, pp. 627-628; 707-708.
11. Gosudarstvennaya farmakopeya XI izd., M.: Meditsina, 1990, No 2, C. 41-59.
12. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii XII izd. – Chast' 1, M.: Izd-vo: Nauchnyi tsentr ekspertizy sredstv meditsinskogo naznacheniya, 2008, 704 p.
13. Rudakov O.B., Vostrov I.A., Fedorov S.V. et al. Sputnik khromatografista. Metody zhidkostnoi khromatografii, Voronezh: Izd-vo «Vodolei», 2004, 528 p.
14. Geiss F. Osnovy tonkosloinoi khromatografii, M.: Mir, 1999, 405 p.
15. Checheta O.V., Safonova E.F., Slivkin A.I. Izuchenie khromatograficheskikh kharakteristik β -karotina v tonkom sloe sorbenta [The study of the chromatographic characteristics β -carotene in a thin layer of sorbent], Pharmaceutical Chemistry Journal, 2012, V. 46, No 5, pp. 54-56.
16. Borodina E.V., Kitaeva T.A., Safonova E.F. et al. Opredelenie α -tokoferola i ergokal'tsiferola metodom tonkosloinoi khromatografii [Determination of α -tocopherol and ergocalciferol by Thin-Layer Chromatography], Journal of Analytical Chemistry, 2007, V. 62, No 11, pp. 1181-1185.

Тринеева Ольга Валерьевна – к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Сафонова Елена Федоровна - к.х.н., доцент, заведующая кафедрой фармации последипломного образования ВГУ, Воронеж

Сливкин Алексей Иванович - д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Trineeva Olga V. - the candidate pharm. sciences, the senior lecturer to faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh, trineevaov@mail.ru

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

Slivkin Alexey I. - the doctor pharm. sciences, the professor, manager of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, the dean of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh