

А. С. Осипов, Е. Б. Нечаева

ПРИМЕНЕНИЕ КАПРОНОВОЙ И ЦИКЛОГЕКСАНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТ ДЛЯ АНАЛИЗА БЕНЗОЙНОЙ И СОРБИНОВОЙ КИСЛОТ

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздравсоцразвития, Москва, Россия

Исследована возможность применения капроновой и циклогексанкарбонной кислот для анализа соответственно сорбиновой и бензойной кислот. Наличие двойных связей в молекулах сорбиновой и бензойной кислот значительно уменьшает времена удерживания соединений по сравнению с их насыщенными аналогами (капроновой и циклогексанкарбонной кислотами) на хроматографических колонках с алкильными заместителями. На колонках с фенильными и нитрильными заместителями присутствие двойных связей оказывает меньшее влияние на удерживание соединений. На хроматографических колонках с алкильными заместителями с использованием исследованных подвижных фаз (метанол, 20 мМ KH_2PO_4 (рН 3,0) или ацетонитрил, 20 мМ KH_2PO_4 (рН 3,0)) невозможно разделить сорбиновую и бензойную кислоты. Однако на колонках с нитрильными и фенильными сорбентами эти кислоты разделяются. Наилучшее разделение кислот достигнуто на колонке Диасфер С10СН.

Ключевые слова: ВЭЖХ; сорбиновая кислота; бензойная кислота.

Бензойная и сорбиновая кислоты, а также их калийные и натриевые соли [1–3] применяются в фармацевтической и пищевой промышленности как antimicrobные консерванты. Консерванты описаны в Британской и Американской фармакопеех, однако методики их анализа с помощью ВЭЖХ в них не приведены. Для хроматографирования сорбиновой кислоты наиболее рационально использовать подвижные фазы с кислым значением рН или с ион-парными реагентами [4]. Необходимо отметить, что в продуктах питания в качестве консервантов могут одновременно применяться сорбиновая и бензойная кислоты [5]. При определении сорбиновой и бензойной кислот в продуктах питания применяют метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) или нормально-фазовую ВЭЖХ. При проведении ТСХ для анализа кислот в качестве подвижной фазы используют смесь растворителей: петролейный эфир – хлороформ – диэтиловый эфир – муравьиная кислота (20,0: 8,0: 2,8: 1,2). Хроматографирование проводят на пластине "Силуфол УФ 254". При анализе кислот методом ВЭЖХ применяют хроматографическую колонку, заполненную силикагелем "Силасобр 600", 5 мкм. В качестве элюента применяют смесь растворителей: изооктан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (100: 12: 0,1). Подготовка проб основана на из-

влечении бензойной и сорбиновой кислот из пищевых продуктов перегонкой с паром и/или экстракцией органическими растворителями [5].

Следует отметить, что подавляющее большинство лекарственных препаратов анализируется в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Кроме того, подготовка проб лекарственных препаратов для нормально-фазовой хроматографии в большинстве случаев более трудоёмка. По этой причине экспериментальная часть работы была посвящена разработке хроматографических условий определения сорбиновой и бензойной кислот в условиях обращенно-фазовой хроматографии. Цель работы — исследовать возможность применения капроновой и циклогексанкарбонной кислот для проверки пригодности хроматографической системы при анализе бензойной и сорбиновой кислот.

Экспериментальная часть

Работа проводилась с использованием хроматографа "Agilent" серия 1100 (Agilent Technologies, США). При хроматографировании применяли колонки производства фирм БиоХимМак (Россия) и Phenomenex (США). Использовали капроновую и циклогексанкарбонную кислоты производства Fluka (США, Швейцария), для хро-

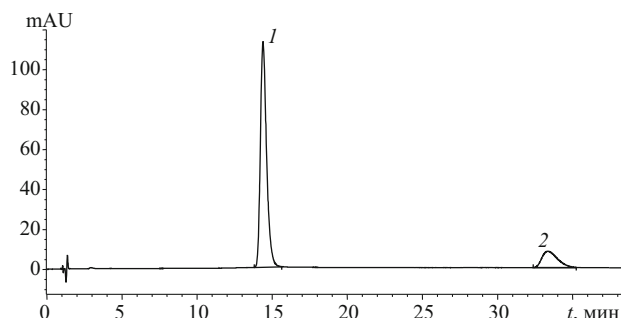


Рис. 1. Хроматограмма разделения модельной смеси бензойной и циклогексанкарбонной кислот. Условия анализа: колонка — Диасфер-110-С18, 100 × 4,0 мм, 5 мкм; скорость потока — 0,8 мл/мин; подвижная фаза — буферный раствор (рН 3) — метанол, 7:3; детектирование при 210 нм. 1 — бензойная кислота, 2 — циклогексанкарбонная кислота.

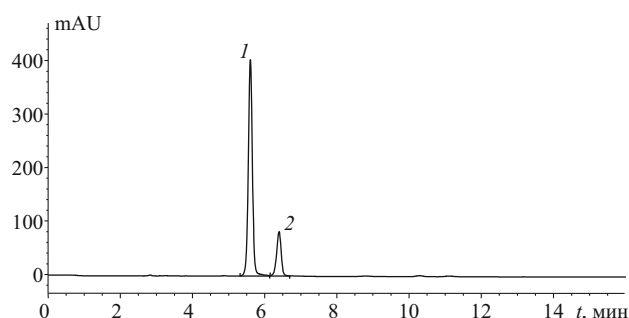


Рис. 2. Хроматограмма разделения модельной смеси сорбиновой и капроновой кислот. Условия анализа: колонка — Диасфер-110-Нитрил, 250 × 4,0 мм, 5 мкм; скорость потока — 0,8 мл/мин; подвижная фаза — буферный раствор (рН 3) — ацетонитрил, 7:3; детектирование при 210 нм. 1 — сорбиновая кислота, 2 — капроновая кислота.

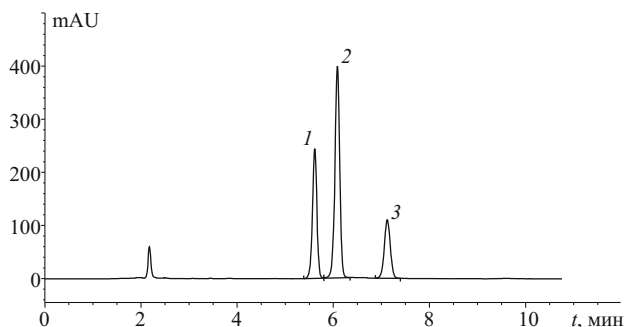


Рис. 3. Хроматограмма разделения модельной смеси сорбиновой, бензойной, капроновой и циклогексанкарбоновой кислот: 1 — сорбиновая кислота, 2 — бензойная кислота, 3 — капроновая и циклогексанкарбоновая кислоты. Условия анализа: колонка — Диасфер-110-C10CN, 250 × 4,0 мм, 5 мкм; скорость потока — 0,8 мл/мин; подвижная фаза — буферный раствор метанол (рН 3), 7:3; детектирование при 210 нм.

матографирования — стандартные образцы бензойной и сорбиновой кислот (Sigma, США).

Результаты и их обсуждение

Для более детального исследования условий анализа кислот проведена серия экспериментов по хроматографированию сорбиновой кислоты и её полностью насыщенного аналога — капроновой кислоты и соответственно бензойной и циклогексанкарбоновой кислоты с использованием основных типов сорбентов, которые применяются в обращенно-фазовой хроматографии. Некоторые результаты разделения модельных смесей приведены в табл. 1 и 2. Определено, что пары сорбиновая — бензойная кислота и капроновая — циклогексанкарбоновая кислота обладают весьма близкими хроматографическими свойствами. Наличие двойных связей в молекулах сорбиновой и бензойной кислот заметно уменьшают времена

удерживания соединений (рис. 1) по сравнению с их насыщенными аналогами на хроматографических колонках с алкильными заместителями (C12, C16 и C18). На колонках с фенильными группировками (Диасфер фенил, Synergi Polar) присутствие двойных связей оказывает меньшее влияние на удерживание соединений. На колонках с нитрильными заместителями (Диасфер-110 нитрил, Диасфер C10CN) различие в гидрофобности сказывается в ещё меньшей степени (рис. 2), либо, в случае хроматографирования на колонке Диасфер-110 нитрил, бензойная и циклогексанкарбоновая кислота не разделяются (табл. 1). Специфическая сорбция бензойной и сорбиновой кислот на колонках с фенильными и нитрильными сорбентами обусловлена π - π взаимодействиями между π -связями функциональных групп сорбентов и системами сопряжённых двойных связей молекул кислот. Аналогичная селективность колонок с данными сорбентами к бензольным кольцам соединений наблюдалась при хроматографировании антиоксидантов бутилгидроксианизола и бутилгидрокситолуола [6, 7]. Капроновая и циклогексанкарбоновая кислоты могут быть использованы для проверки пригодности хроматографической системы при анализе сорбиновой и бензойной кислот на колонках с нитрильными заместителями.

Необходимо отметить, что на хроматографических колонках с алкильными заместителями с использованием исследованных подвижных фаз невозможно разделить сорбиновую и бензойную кислоты. Однако на сорбентах с нитрильными и фенильными группировками данные кислоты должны разделяться (табл. 3), элюирование соединений осуществляется в соответствии с числом двойных связей в молекуле. Наилучшее разделение было достигнуто на колонке Диасфер C10CN (рис. 3). Капроновая и циклогексанкарбоновая кислоты обладают большей гидрофобностью и на данной колонке не разделяются.

Таблица 1

Хроматографирование модельной смеси сорбиновой и капроновой кислот

Условия хроматографии: колонка, подвижная фаза, скорость потока	Коэффициент ёмкости		Селективность сорбента к паре капроновая / сорбиновая кислоты
	сорбиновой кислоты	капроновой кислоты	
Диасфер-110-C16 150 × 4,0 мм, ацетонитрил, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	4,61	8,91	1,93
Диасфер-110-фенил 250 × 4,0 мм, ацетонитрил, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	3,37	5,02	1,49
Диасфер-110-нитрил 250 × 4,0 мм, ацетонитрил, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	1,69	2,07	1,22
Диасфер-110-C18 100 × 4,0 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	16,38	38,00	2,32
Диасфер-110-фенил 150 × 4,6 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 1,0 мл/мин	6,50	10,19	1,57
Диасфер-110-нитрил 250 × 4,0 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	1,658	1,75	1,056
Диасфер-110-C18 100 × 4,0 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 50:50, 0,8 мл/мин	3,51	8,15	2,32
Диасфер-110-фенил 150 × 4,6 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 50:50, 1,0 мл/мин	2,26	3,26	1,44
Диасфер-110-C10CN 100 × 4,0 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 50:50, 0,8 мл/мин	3,09	4,686	1,52
Synergi Polar 100 × 4,6 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 50:50, 1,0 мл/мин	2,92	4,06	1,39
Synergi Max RP 260 × 4,6 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 40:60, 1,0 мл/мин	2,545	4,27	1,677

Хроматографирование модельной смеси бензойной и циклогексанкарбоновой кислот

Условия хроматографии: колонка, подвижная фаза, скорость потока	Коэффициент ёмкости		Селективность сорбента к паре циклогексанкарбоновая / бензойная кислоты
	бензойной кислоты	Циклогексан карбоновой кислоты	
Диасфер-110-С16 150 × 4,0 мм, ацетонитрил, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	4,68	8,43	1,80
Диасфер-110-фенил 250 × 4,0 мм, ацетонитрил, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	3,63	4,98	1,39
Диасфер-110-нитрил 250 × 4,0 мм, ацетонитрил, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	1,85	2,06	1,116
Диасфер-110-С18 100 × 4,0 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	15,60	37,48	2,40
Диасфер-110-фенил 150 × 4,6 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 1,0 мл/мин	6,85	11,24	1,64
Диасфер-110-нитрил 250 × 4,0 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	1,90 соединения не разделяются	1,90 соединения не разделяются	1,00
Диасфер-110-С18 100 × 4,0 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 50:50, 0,8 мл/мин	3,80	8,334	2,19
Диасфер-110-фенил 150 × 4,6 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 50:50, 1,0 мл/мин	2,30	3,54	1,54
Диасфер-110-С10СН 100 × 4,0 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 50:50, 0,8 мл/мин	3,955	5,16	1,305
Synergi Polar 250 × 4,6 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 50:50, 0,8 мл/мин	3,13	4,53	1,45
Synergi Max RP 250 × 4,6 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 40:60, 1,0 мл/мин	2,61	4,13	1,584

Таблица 3

Селективность сорбента к паре бензойная/сорбиновая кислоты

Условия хроматографии: колонка, подвижная фаза, скорость потока	Селективность сорбента к паре бензойная/сорбиновая кислоты
Диасфер-110-фенил 250 × 4,0 мм, ацетонитрил, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	1,077
Диасфер-110-нитрил 250 × 4,0 мм, ацетонитрил, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	1,094
Диасфер-110-нитрил 250 × 4,0 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 30:70, 0,8 мл/мин	1,14
Диасфер-110-С10СН 100 × 4,0 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 50:50, 0,8 мл/мин	1,28
Synergi Polar 250 × 4,6 мм, метанол, 20 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 3,0), 50:50, 0,8 мл/мин	1,07

ЛИТЕРАТУРА

1. *British Pharmacopoeia 2009*, Monograph: Potassium Sorbate.
2. *The United States Pharmacopoeia 31*, National Formulary 29. Monograph: Sodium Benzoate.
3. *The United States Pharmacopoeia 31*, National Formulary 29. Monograph: Potassium Benzoate.
4. Е. А. Музыка, А. С. Осипов, Тез. докл. XVII Российского национального конгресса "Человек и лекарство", Москва (2010), с. 685.
5. *Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов*, И. М. Скурихин, В. А. Тутельян (ред.), Медицина, Москва (1998), сс. 330 – 337.
6. К. В. Ноздрин, А. С. Осипов, *Ретиноиды*, выпуск 25, ЗАО "Ретиноиды", Москва (2007), сс. 56 – 62.
7. К. В. Ноздрин, А. А. Великородный, А. С. Осипов, Г. М. Родионова, *Фармация*, № 5, 7 – 10 (2007).

Поступила 11.11.11

THE USE OF CAPROIC AND CYCLOHEXANECARBOXYLIC ACIDS FOR DETERMINING BENZOIC AND SORBIC ACIDS

A. S. Osipov and E. B. Nechaeva

State Scientific Center for Drug Expertise and Control, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The possibility of using caproic and cyclohexanecarboxylic acids for determining sorbic and benzoic acids, respectively, has been studied. The presence of double bonds in the molecules of sorbic and benzoic acids significantly reduces the retention times of these compounds in comparison to their saturated analogues (caproic and cyclohexanecarboxylic acids) on the chromatographic columns with alkyl substituents. On the columns with phenyl and nitrile substituents, the presence of double bonds has less effect on the retention of compounds. By column chromatography on alkyl substituents with methanol – 20 мМ КН₂РО₄ (рН 3,0) or acetonitrile – 20 мМ КН₂РО₄ (рН 3,0) mobile phases, it is impossible to separate sorbic and benzoic acids. However, these acids can be separated on columns with sorbents containing nitrile and phenyl groups. The best separation of sorbic and benzoic acids was achieved on a Diasfer C10CN column.

Key words: HPLC; benzoic acid; sorbic acid