

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2013

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

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА А В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Обоснованы оптимальные условия определения витамина А методом хроматографии и показана возможность теоретического подхода к выбору параметров хроматографического определения ретинола ацетата в тонком слое сорбента.

Ключевые слова: витамин А; ТСХ.

Витамин А и его эфиры (ацетат, пропионат и пальмитат) принадлежат к обширному классу природных соединений группы каротиноидов. Это жирорастворимые витамины, обладающие антиксерофтальмической, регенерирующей и антиоксидантной активностью. Они необходимы для роста и размножения клеток, нормальной деятельности органов зрения, способствуют нормальному обмену веществ [1]. Структурная формула ретинола ацетата представлена на рис. 1.

В последние 10 лет большинство публикаций посвящено физико-химическим методам при контроле качества лекарственных препаратов (ЛП), содержащих витамины группы А, как наиболее экспрессным, чувствительным и информативным [2–4]. Более объективный качественный и количественный анализ позволяют получить хроматографические методы, из которых наибольшее распространение получили тонкослойная хроматография (ТСХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [2–8]. ТСХ является важным методом идентификации и определения степени чистоты масляных препаратов витамина А [5–8], а также разделения других жирорастворимых витаминов и стероидов, часто сопутствующих им в природных источниках и ЛП.

В ТСХ на процесс хроматографирования влияют существенным образом растворитель, сорбент и условия анализа [6–10]. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение различных элюирующих систем и выбора оптимальных условий хроматографирования, позволяющих провести определение витамина А методом ТСХ.

Экспериментальная часть

На стартовую линию хроматографической пластинки (сорбент — силикагель) марки “Sorbfil” (тип ПТСХ-А) 10 × 10 см с полимерной подложкой (Россия) наносили по 0,5 мкл пробы раствора ретинола ацетата с содержанием 1 мг/мл с помощью микрошприца объемом 1 мкл (МШ-1). Для приготовления

элюентов использовали растворители марки х.ч. (ЗАО “Вектон”, Россия). Для каждой элюирующей системы рассчитаны полярность (P') [10], а также такие хроматографические параметры витамина А, как R_f и коэффициент распределения (K).

Результаты и их обсуждение

Выбор обнаруживающего реагента осуществляли с учетом таких требований как специфичность, высокая чувствительность, доступность и высокое качество получаемой хроматограммы. Для обнаружения пятен ретинола ацетата (ФС 42-7811-97), который выбран в качестве стандарта для разработки методики, использованы реагенты, предложенные в [5–8]. Обработка пластин концентрированной серной кислотой дает темно-фиолетовые зоны на белом фоне, разбавленной серной кислотой — синие пятна на белом фоне, 5 % спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты (ФМК) и 10 % спиртовым раствором ФМК с добавлением концентрированной хлористоводородной кислоты для повышения чувствительности — темно-синие пятна на желто-зеленом фоне и 70 % хлорной кислотой — фиолетовые пятна на белом фоне. В литературе часто рекомендуется для этой цели использовать хлороформный раствор хлорида сурьмы (III или V) [8]. Однако следует отметить, что данный реагент труднодоступен и весьма токсичен. Детектирование пятен проводят также путем просмотра хроматограмм в УФ-свете. Наблюдаются темные зоны витамина А на светлом флуоресцирующем фоне [8].

В результате установлено, что первый реагент вызывает обугливание пластин для ТСХ, второй — дает размытые пятна, чувствительность третьего недостаточна, пятый проявитель образует нечеткую картину и очень токсичен. Детектирующим реагентом, отвечающим всем требованиям, является 10 % спиртовый раствор ФМК с добавлением концентрированной хлористоводородной кислоты. Нами также установлено, что предел обнаружения с помощью выбранного детектирующего агента составил $1 \cdot 10^{-7}$ г (0,1 мкл раствора с

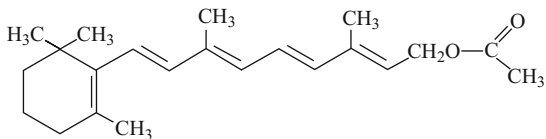


Рис. 1. Структурная формула ретинола ацетата.

концентрацией 1 мг/мл), что сопоставимо по чувствительности с определением витамина А на приборе ВЭЖХ [2 – 4]. ФМК является неспецифичным реагентом и, кроме витамина А, обнаруживает многие другие компоненты и примеси [5].

Для обоснования возможности использования теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографирования ретинола ацетата необходимо было изучить влияние полярности элюентов на хроматографическую подвижность витамина А в тонком слое. В литературе для этих целей чаще всего предлагаются такие однокомпонентные системы как бензол, хлороформ, гексан, циклогексан, толуол, ксилол, метанол и другие [5 – 8]. В эксперименте изучено 10 типов элюирующих систем с различными значениями полярности (таблица).

Оптимальные величины R_f , согласно [9], и лучшее качество хроматографических зон было достигнуто в системах 8 и 9. Установлено, что на значение R_f и качество хроматографических зон влияет не только значение полярности системы, но ее качественный и количественный состав. Системы 3 и 4, имеющие близкие значения полярности, непригодны для использования ввиду неприемлемого значения R_f для витамина А (таблица).

При варьировании соотношением гексана и хлороформа в двухкомпонентных подвижных фазах 1 – 3, 6 – 9 (таблица) были получены кривые зависимости величины относительной скорости перемещения вещества от процентного содержания каждого компонента в элюенте (рис. 2, а и б). Полученные зависимости позволили установить, что для достижения оптимальной величины R_f [9] содержание гексана и хлороформа в системе должно быть от 70 до 80 и от 30 до 20 % соответственно.

По полученным данным построена кривая зависимости величины относительной подвижности (R_f) витамина А (рис. 3) от полярности системы (P') в интер-

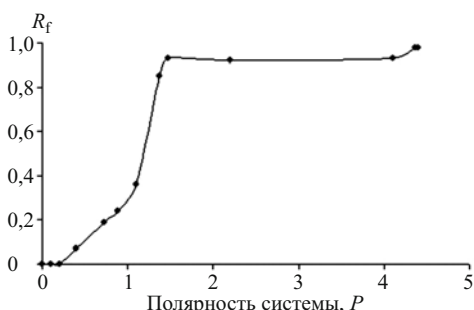


Рис. 3. Кривая зависимости R_f от полярности элюирующей системы в диапазоне от 0 до 4,4.

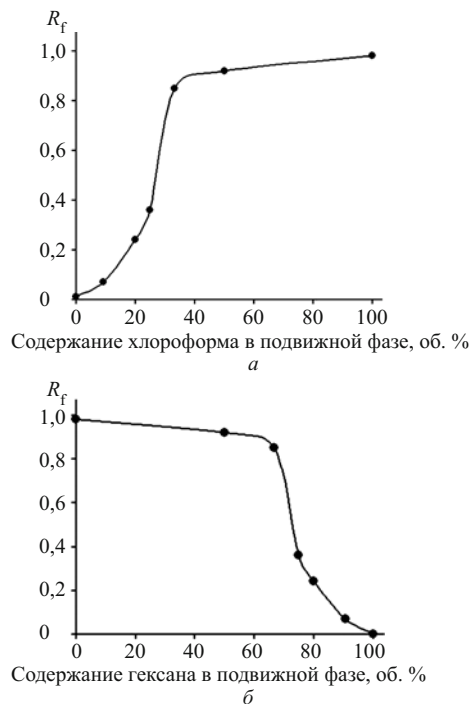


Рис. 2. Зависимость относительной скорости перемещения ретинола ацетата от содержания хлороформа (а) и гексана (б) в подвижной фазе (неподвижная фаза – силикагель).

вале от 0 до 4,4 ед. полярности. Как видно из графика на рис. 3, при достижении величины $P' = 1,5$ ед. и более значение параметра R_f ретинола ацетата перестает зависеть от полярности элюента, и определяемый компонент не сорбируется неподвижной фазой ($R_f \rightarrow 1$).

При более детальном изучении влияния полярности системы на величину R_f в диапазоне от 0,1 до 1,5 ед. был выбран интервал значений P' элюента, в котором данная зависимость становится линейной (от 0,2 до 1,1 ед. полярности системы) (рис. 4). Проведена статистическая оценка параметров линейной зависимости путем расчета величины коэффициента корреляции (R^2). Установлено, что для полученной зависимости $|R^2| = 0,9907$ (рис. 4). Уравнение линейной зависимости приведено на рис. 4. С помощью предложенной зависимости можно подбирать различные системы для определения витамина А в тонком слое сорбента, чтобы величина R_f укладывалась в оптимальные значения

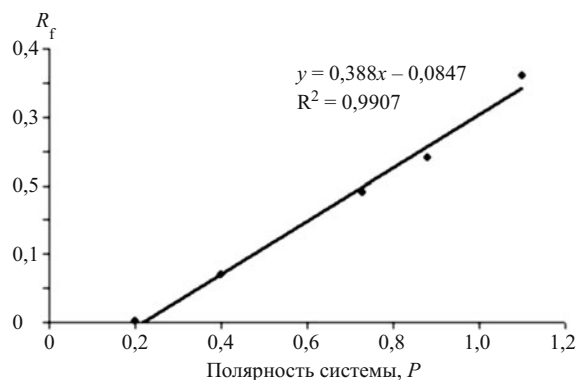


Рис. 4. Линейная зависимость R_f от полярности элюента.

Характеристики элюирующих систем для определения витамина А

Система	Состав элюирующей системы	Соотношение растворителей	Полярность системы (P')	R_f	К
1	<i>n</i> -гексан	—	0	0,01 ± 0,002	99,00
2	гексан – хлороформ	1:1	2,20	0,92 ± 0,01	0,09
3	гексан – хлороформ	2:1	1,47	0,85 ± 0,02	0,18
4	гексан – этилацетат	2:1	1,43	0,98 ± 0,01	0,02
5	гексан – этанол	15:0,1	0,03	0,88 ± 0,01	0,14
6	гексан – хлороформ	10:1	0,40	0,07 ± 0,01	13,29
7	гексан – хлороформ	5:1	0,73	0,19 ± 0,01	4,26
8	гексан – хлороформ	4:1	0,88	0,24 ± 0,01	3,17
9	гексан – хлороформ	3:1	1,10	0,36 ± 0,01	1,78
10	гексан – бензол	14:1	0,20	0,01 ± 0,002	99,00

[9]. Таким образом, интервал полярностей элюента может варьировать от 0,73 до 1,1 ед.

По совокупности полученных результатов были выбраны оптимальные условия хроматографирования витамина А: сорбент — силикагелевые пластинки марки “Sorbfil” (ПТСХ-А) 10 × 10 см с полимерной подложкой; возможные элюенты — гексан — хлороформ (5:1), (4:1), (3:1); обнаруживающий реагент — 10 % спиртовой раствор ФМК с добавлением концентрированной хлористоводородной кислоты; объем пробы — 0,5 мкл раствора с концентрацией 1 г/мл; время насыщения хроматографической камеры парами элюента — 20 мин; время элюирования — 25 мин; время выдерживания пластинки в термостате при $t = 50 - 60$ °С — 5 – 7 мин.

Разработанная методика определения витамина А апробирована на витаминном лекарственном препарате “Аевит” (ФС 42-1699-95) [11]. На пластинки наносили по 0,5 мкл раствора содержимого 1 капсулы “Аевита” в 10 мл спирта и хроматографировали восходящим способом в системе гексан — хлороформ (3:1). После обработки хроматограмм детектирующим реагентом обнаруживались 2 хроматографические зоны, одна из которых идентифицирована как ретинола ацетат ($R_f = 0,37 \pm 0,01$), а другая, предположительно, относится к витамину Е ($R_f = 0,75 \pm 0,02$).

Таким образом, показана возможность теоретического подхода к выбору условий хроматографического

определения витамина А методом ТСХ. Разработанная методика может быть использована для идентификации ретинола ацетата в комплексных поливитаминных препаратах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. А. Мелентьева, *Фармацевтическая химия некоторых природных веществ с сильным биологическим действием*, Изд-во мед. института им. И. М. Сеченова, Москва (1984), сс. 48 – 56.
2. Э. И. Козлов, И. А. Солунина, М. Л. Любарева, М. А. Надточий, *Хим.-фарм. журн.*, **37**(10), 50 – 53 (2003).
3. С. А. Клюев, *Ж. аналит. химии*, **51**(9), 961 – 963 (1996).
4. Л. В. Денисова, В. Н. Филимонов, Л. Н. Белятинская, И. Ф. Колосова, *Ж. аналит. химии*, **52**(9), 967 – 969 (1997).
5. О. В. Чечета, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин, Г. А. Оголь, *Хим.-фарм. журн.*, **42**(12), 47 – 49 (2008).
6. Ю. Кирхнер, *Тонкослойная хроматография*, Мир, Москва (1981), сс. 402 – 407.
7. М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец, *Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии*, Т. 2, Мир, Москва (1980), с. 610.
8. *Экспериментальная витаминология*, Ю. М. Островский (ред.), Наука и техника, Минск (1979), сс. 80 – 129.
9. Ф. Гейсс, *Основы тонкослойной хроматографии*, Мир, Москва (1999).
10. О. Б. Рудаков, И. А. Востров, С. В. Федоров и др., *Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии*, Водолей, Воронеж (2004).
11. “Аевит в капсулах”, ФС 42-1699-95.

Поступила 18.05.12

CHOICE OF OPTIMUM PARAMETERS FOR VITAMIN A DETERMINATION IN THIN SORBENT LAYER

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

Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia

We have established optimum conditions for the quantitative determination of Vitamin A by the method of thin-layer chromatography (TLC) and showed the possibility of a theoretical approach to the choice of optimum parameters for TLC determination of retinol acetate.

Keywords: vitamin A; thin-layer chromatography