

УДК 543.544.6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В ВИТАМИННЫХ ПРЕМИКСАХ, БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ВЫСОКО-ЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ГРАДИЕНТНЫМ ЭЛЮИРОВАНИЕМ

А.А. Бендрышев, Е.Б. Пашкова, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии; e-mail: zhab@mail.ru)

Изучено влияние pH подвижной фазы и температуры на удерживание и разделение 14 витаминов и витаминных форм на четырех различных неподвижных фазах. Предложены хроматографические условия, позволяющие разделить 12 водорастворимых витаминов и витаминных форм. Установлено, что наилучшего разделения водорастворимых витаминов удается достигнуть при градиентном элюировании. Подвижная фаза А – (0,6%-я фосфорная кислота) pH 1,5–1,8; подвижная фаза Б – ацетонитрил. При разделении никотиновой и аскорбиновой кислот более предпочтительно использовать неподвижные фазы “Luna C18(2)” и “Gemini C18”, а при необходимости разделения рибофлавина и рибофлавин-5-фосфата – неподвижные фазы “Synergi Hydro RP” и “Zorbax SB-C18”. Подобранные условия использованы при определении витаминов в коммерческих образцах витаминных препаратов. Полученные результаты хорошо согласуются с паспортными данными.

Ключевые слова: водорастворимые витамины, ВЭЖХ, хроматография, фармацевтические препараты, БАД, премиксы.

Введение

К водорастворимым витаминам относят соединения, имеющие очень разное строение и свойства. Как правило, в эту группу включают аскорбиновую кислоту (С), тиамин (В1), никотинамид (в разных источниках фигурирует как РР, В3, или В5), пиридоксин (В6), пантотеновую кислоту (в разных источниках фигурирует как В5 или В3), фолиевую кислоту (В9 или ВС), цианокобаламин (В12), рибофлавин (В2), биотин (Н) и иногда рутин (Р) [1, 2]. Ряд витаминов, помимо приведенных выше химических соединений, может существовать и в виде других веществ (витаминных форм). Например, витамин РР вводится в витаминизированные смеси или в виде никотинамида, или в виде никотиновой кислоты.

В рецептуру витаминизированных смесей входят сразу несколько витаминов, и существует необходимость определения содержания каждого из них, причем как в исходной смеси, так и в обогащенных ею продуктах питания. В настоящее время, согласно методикам, приведенным в двенадцатом издании Государственной фармакопеи Российской Федерации, каждый витамин определяется отдельно, причем используемые методы анализа зачастую являются устаревшими и трудоемкими (титрование, тонкослойная хро-

матография) [3]. Высоко-эффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – один из самых популярных методов определения водорастворимых витаминов, благодаря возможности одновременного определения сразу нескольких соединений. В большинстве случаев для определения витаминов используют обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ [4–22]. Одновременное определение всех водорастворимых витаминов в изократическом варианте затруднительно. Решить данную проблему можно, используя либо ион-парные реагенты, либо градиентное элюирование. Для одновременного определения нескольких витаминов традиционно используется вариант ион-парной хроматографии [5–9]. Однако часто не удается достигнуть полного разрешения пиков отдельных витаминов друг с другом и с присутствующими в образце компонентами матрицы. Ион-парный вариант предоставляет в данном случае очень небольшие возможности по улучшению разрешения соседних пиков.

Более перспективно, на наш взгляд, для решения данной задачи использовать градиентное элюирование. Существуют работы по определению групп водорастворимых витаминов в разных объектах с помощью метода градиентного элюирования [10–14], однако в

данном вопросе до сих пор много не до конца ясных моментов. В частности, в разных работах порядок элюирования витаминов различается даже в случае применения сходных подвижных фаз. При подборе оптимальных условий используют заметно отличающиеся подвижные и неподвижные фазы, отсутствует единый подход к процедуре пробоподготовки. Мало внимания уделено разделению витаминных форм, а также вопросу устойчивости витаминов и их форм в процессе пробоподготовки и разделения. Кроме того, заметно различаются условия детектирования [1, 2].

Цель нашей работы – создание способа определения водорастворимых витаминов методом ВЭЖХ в режиме градиентного элюирования и оптимизация условий их разделения.

Экспериментальная часть

Хроматографическая система. В работе использовали жидкостный хроматограф “Agilent 1100” (“Agilent”, США), состоящий из градиентного насоса, дегазатора подвижной фазы, автосамплера, термостата колонок и детектора на диодной матрице. Для разделения использовали хроматографическую колонку “Synergi 4u Hydro-RP” (250×4,6 мм) (“Phenomenex”, США), “Luna C18(2) 5u” 250×4,6 мм (“Phenomenex”, США), “Gemini 5u C18” 250×4,6 мм (“Phenomenex”, США), “Zorbax SB-C18” 250×4,6 мм (“Agilent”, США). При работе все колонки оснащались предколонами “Security Guard C18” (“Phenomenex”, США). Пробы вводили автосамплером. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл. Для регистрации хроматограмм использовали программно-аппаратный комплекс “Chemstation” (“Agilent”, США).

Реактивы и растворители. В работе применяли следующие реактивы: тиамина хлорид (“ч.д.а.”), тиамина фосфата хлорид (“ч.д.а.”), никотинамид (“ч.д.а.”), аскорбиновую кислоту (“ч.д.а.”), пиридоксин (“ч.д.а.”), пиридоксаль (“ч.д.а.”), пиридоксамин (“ч.д.а.”), пантотеновую кислоту (“ч.д.а.”), фолиевую кислоту (98%), цианокобаламин (“ч.д.а.”), рибофлавин (“ч.д.а.”), рибофлавин-5-фосфат (“ч.д.а.”), никотиновую кислоту (“ч.д.а.”), биотин (“ч.д.а.”), фосфорную кислоту (85%) (“Sigma-Aldrich”, США), ацетонитрил “HPLC-gradient grade” (“Panreac”, Испания), гидрокарбонат натрия (“ч.д.а.”) (“Лабтех”, Россия), дигидрофосфат натрия (“ч.д.а.”) (“Лабтех”, Россия), гидроксид натрия (“ч.д.а.”) (“Лабтех”, Россия).

Приготовление растворов витаминов. Для всех витаминов, кроме рибофлавина, биотина и фолиевой

кислоты, стандартные растворы готовили следующим образом: навеску витамина (примерно 0,1 г) помещали в мерную колбу на 100 мл, добавляли 20 мл деионизованной воды, 1 мл фосфорной кислоты, перемешивали, добавляли 50 мл деионизованной воды и, периодически встряхивая, подвергали действию ультразвука до полного растворения; температура воды в ультразвуковой ванне находилась под контролем и не превышала 25°C. Полученный раствор доводили до метки деионизованной водой и тщательно перемешивали. Добавление фосфорной кислоты необходимо для улучшения стабильности растворов витаминов. Для приготовления стандартных растворов биотина и фолиевой кислоты навеску витамина помещали в колбу 100 мл, добавляли 10 мл деионизованной воды, 2 мл 200 мМ раствора гидрокарбоната натрия, перемешивали, добавляли 60 мл деионизованной воды и, периодически встряхивая, подвергали действию ультразвука до полного растворения; температура воды в ультразвуковой ванне находилась под контролем и не превышала 25°C. Полученный раствор доводили до метки деионизованной водой и тщательно перемешивали. Из-за низкой растворимости рибофлавина навеску этого витамина (примерно 0,03 г) помещали в колбу на 1000 мл, добавляли 200 мл деионизованной воды, 15 мл фосфорной кислоты, перемешивали, добавляли 700 мл деионизованной воды и, периодически встряхивая, подвергали действию ультразвука до полного растворения, температура воды в ультразвуковой ванне находилась под контролем и не превышала 25°C. Полученный раствор доводили до метки деионизованной водой и тщательно перемешивали. Все растворы хранили в темноте при 4°C. Раствор аскорбиновой кислоты сохраняет стабильность в течение суток, растворы остальных витаминов – в течение двух недель. Градуировочные растворы витаминов готовили ежедневно. Концентрацию градуировочных растворов подбирали таким образом, чтобы концентрация разных витаминов и их соотношение были близки к концентрации и соотношению витаминов в анализируемых объектах. В мерную колбу емкостью 25 мл последовательно вносили необходимое количество стандартного раствора, добавляли 0,1 мл фосфорной кислоты, доводили до метки деионизованной водой и тщательно перемешивали. Градуировочные растворы хранили при 4°C.

Результаты и их обсуждение

Для подбора оптимальных условий определения витаминов необходимо изучить влияние на их удерживание хроматографических параметров. Наиболее зна-

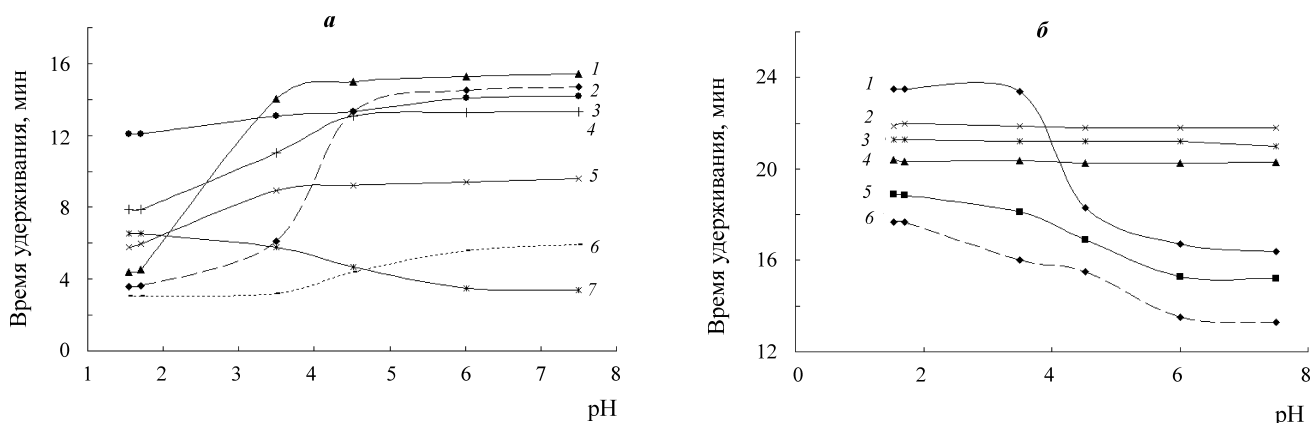


Рис. 1. Зависимости времени удерживания витаминов от pH подвижной фазы: а (1 – никотинамид, 2 – тиамин, 3 – пиридоксин, 4 – пиридоксаль, 5 – никотиновая кислота, 6 – пиридоксамин, 7 – аскорбиновая кислота); б (1 – биотин, 2 – рибофлавин, 3 – рибофлавин-5-фосфат, 4 – цианокобаламин, 5 – фолиевая кислота, 6 – пантотеновая кислота (колонка “Luna C18(2)” 250’4,6мм)

значениях pH карбоксильная группа полностью диссоциируется, в то время как пиридиновый атом азота остается непротонированным. При низких значениях pH ситуация обратная – никотиновая кислота находится в виде протонированного пиридинового основания. При промежуточных значениях pH никотиновая кислота существует в виде смесей описанных выше форм. Изменение времени удерживания никотиновой кислоты при возрастании pH от 1,5 до 3,5 объясняется, по-видимому, увеличением доли форм с диссоциированной карбоксильной группой. При $\text{pH} > 3,5$ дополнительной диссоциации карбоксильной группы не происходит (она полностью диссоциирована), а степень протонирования атома азота уменьшается по мере увеличения pH, т.е. время удерживания в этом интервале pH зависит от доли форм с протонированным атомом азота пиридинового кольца.

Время удерживания никотинамида ($\text{pK}_a = 3,3$) при увеличении pH от 1,5 до 3,5 увеличивается с 4,5 до почти 16 мин. При дальнейшем увеличении pH время удерживания еще немного возрастает. При низких значениях pH никотинамид находится полностью в протонированной форме, а эндкепирующие группы сорбента недиссоциированы, при высоких значениях pH происходит диссоциация групп неподвижной фазы, а доля протонированного никотинамида в смеси уменьшается. Как видно из зависимостей, депротонирование заряженного атома азота пиридинового кольца витаминов в совокупности с ионизацией привитых гидроксильных групп сорбента приводит к улучшению сорбции – время удерживания возрастает. Время удерживания аскорбиновой кислоты при увеличении pH уменьшается от 6,5 до 3,4 мин. Аскорбиновая кислота является двухосновной ($\text{pK}_{a1} = 4,18$, $\text{pK}_{a2} =$

11,6) и диссоциирует уже при сравнительно низких значениях pH. Способность витамина С к такой диссоциации, безусловно, влияет на время удерживания его на неподвижных фазах. Поскольку диссоциация витамина С по второй ступени происходит в незначительной степени, можно заключить, что аскорбиновая кислота в форме дианиона отсутствует в смеси, а следовательно, не влияет на сорбцию витамина в целом. Удерживание объясняется, по всей видимости, присутствием незаряженной и анионной форм витамина С, а также ионизацией групп сорбента.

Пантотеновая кислота имеет $\text{pK}_a = 4,41$, в связи с чем при увеличении pH среды она переходит в анионную форму. Время удерживания пантотеновой кислоты снижается от 18 до 13 мин при увеличении pH от 1,5 до 7,5 соответственно. Время удерживания фолиевой кислоты ($\text{pK}_a = 2,3; 8,3$) несколько больше, чем пантотеновой, но тенденции изменения этого параметра в целом аналогичны. При значении pH 1,5 и 7,5 он составляет 19 и 15 мин соответственно.

Время удерживания биотина относительно постоянно в интервале pH от 1,5 до 4 (23 мин), однако при дальнейшем повышении pH подвижной фазы наблюдается его резкое снижение до 16 мин; pK_a карбоксильной группы биотина составляет величину порядка 4,5, поэтому в области высоких значений pH биотин полностью находится в анионной форме, которая удерживается на колонке слабее.

Время удерживания рибофлавина ($\text{pK}_a = 10,2$) практически не изменяется при варьировании pH элюента. Молекула рибофлавина не содержит групп, способных к диссоциации в исследуемом интервале pH. Для рибофлавин-5-фосфата при увеличении pH наблюдается небольшое снижение времени удержива-

ния (менее чем на минуту). Время удерживания цианокобаламина мало зависит от величины рН.

Молекула тиамин включает в себя положительно заряженный тиазольный фрагмент, вследствие чего является высокополярным органическим соединением. При $\text{pH} < 3,5$ тиамин имеет малое время удерживания (порядка 3,8 мин). При увеличении pH ($> 3,5$) время удерживания тиамин резко возрастает до 14 мин, а при дальнейшем увеличении pH мало изменяется. Это объясняется, по-видимому, тем, что при $\text{pH} > 3,5$ тиамин переходит в форму свободного основания, т.е. происходит депротонирование атома азота пиримидинового кольца, и данный фрагмент молекулы становится незаряженным, что открывает возможность для осуществления взаимодействия между С18-группами сорбента и молекулой тиамин.

Тиамин монофосфат ведет себя аналогично тиамину и имеет близкое время удерживания в диапазоне от 1,5 до 5,5 pH (3,5 мин при pH 1,7). До конца разделить эти вещества в данном диапазоне pH не удастся. При повышении pH до 5,5 время удерживания тиамин монофосфата увеличивается до 14 мин.

Пиридоксин является производным пиридина, в его молекуле присутствует атом азота пиридинового кольца, обладающий ярко выраженными основными свойствами. Для пиридоксин отмечено относительно небольшое увеличение времени удерживания с ростом pH от 12 до 15 мин. Пиридоксамин при pH 1,5 слабо удерживается на неподвижной фазе (3,1 мин). С увеличением pH до 7 время удерживания пиридоксамин вырастает до 6 мин. При дальнейшем увеличении pH наблюдается резкое увеличение времени удерживания до 14 мин при pH 8. Для пиридоксаль при увеличении pH от 1,5 до 5 время удерживания вырастает с 7 до 14 мин, а затем остается практически постоянным.

Влияние неподвижной фазы

По литературным данным [1, 2], наиболее часто для разделения водорастворимых витаминов используют обращенные фазы С18. Однако колонки С18 разных марок могут обладать заметно отличающимися свойствами, что связано с различиями в используемых исходных силикагелях и полимерах, процедурах синтеза, плотности прививки С18-групп и эндкепирования. Такие различия могут заметно влиять на удерживание соединений. Поэтому для выяснения оптимальных условий разделения мы рассмотрели несколько типов колонок. В ходе работы исследования проводили на неподвижных фазах “Synergi Hydro RP C18”, “Gemini C18”, “Luna C18(2)” и “Zorbax SB-C18”. К сожалению, полная информация о

колонок далеко не всегда предоставляется производителями, однако основные их особенности известны. Так, колонка “Synergi Hydro RP” имеет гидрофильный эндкепинг, что должно обеспечивать лучшее удерживание и разделение гидрофильных соединений. При синтезе колонки “Gemini C18” в качестве основы вместо силикагеля использовали гибридную силикагельно-полимерную матрицу, что позволяет колонке работать как в сильнощелочной, так и в сильнокислой области pH и исключает взаимодействие соединений с силанольными группами. Колонка “Luna C18(2)” представляет собой колонку с увеличенной плотностью прививки функциональных групп, что должно обеспечивать более сильное экранирование поверхности зерна сорбента и общее увеличение емкости колонки, а следовательно, увеличение времени удерживания и некоторое улучшение селективности. Колонка “Zorbax SB-C18” способна за счет специального эндкепинга работать при низких значениях pH . Наличие специального эндкепинга может приводить к изменению в селективности и емкости.

По результатам экспериментов исследованные неподвижные фазы можно разделить на две группы. К первой группе относятся фазы “Luna C18(2)” и “Gemini C18”, а ко второй – “Synergi Hydro RP” и “Zorbax SB-C18”. Различие между этими группами хорошо заметно при pH 1,5–1,8. Ряды селективности для неподвижных фаз “Luna C18(2)” и “Synergi Hydro RP” приведены на рис. 2.

При разделении витаминов на неподвижных фазах “Luna C18(2)” и “Gemini C18” при pH 1,5–1,8 никотиновая кислота элюируется перед аскорбиновой кислотой. Пики этих соединений хорошо разрешены между собой и с пиком никотинамида. Пики тиамин, никотинамида и других полярных соединений симметричны, разрешение достаточно для одновременного количественного определения тиамин, никотинамида, никотиновой и аскорбиновой кислот. Значения времени удерживания для пар рибофлавин–рибофлавин-5-фосфата и тиамин–тиамин фосфат практически совпадают, что не позволяет разделить эти соединения. Кроме того, время удерживания цианокобаламина также очень близко к времени удерживания рибофлавин-5-фосфата. Следует отметить, что время удерживания соединений на колонке “Gemini C18” несколько меньше, чем на остальных колонках. При разделении с использованием колонок “Synergi Hydro” и “Zorbax SB C18” при pH 1,5–1,8 аскорбиновая кислота элюируется перед никотиновой кислотой, при этом пики соединений не разделены до базовой линии. Пики никотинамида и тиамин несколько несимметричны, причем

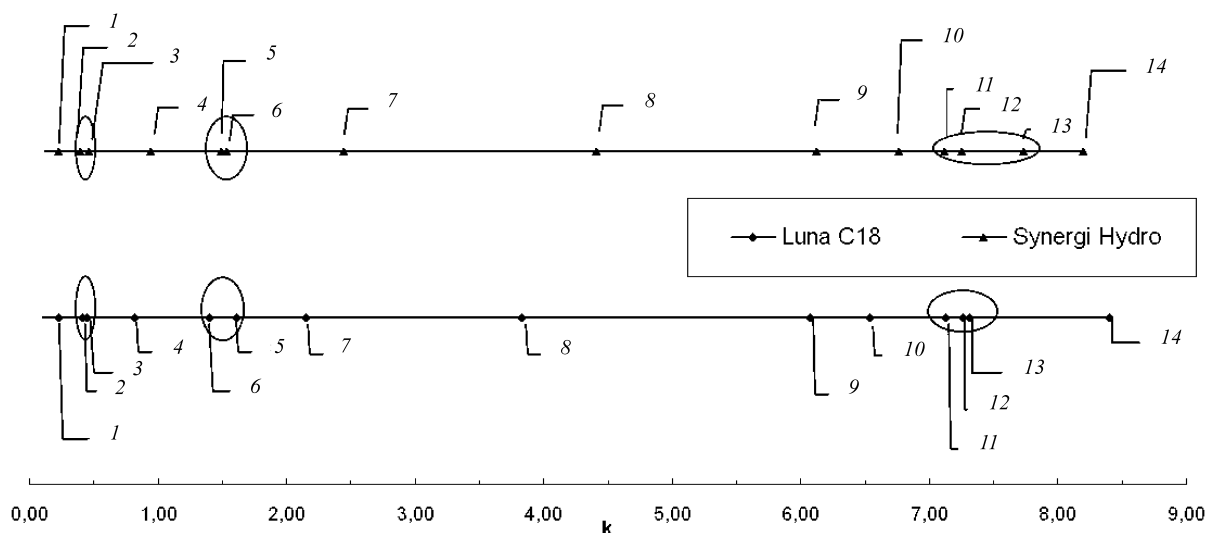


Рис. 2. Ряды селективности для неподвижных фаз “Luna C18(2)” и “Synergi Hydro RP”. рН подвижной фазы 1,7. Условные обозначения: 1 – пиридоксамин, 2 – тиамин фосфат, 3 – тиамин, 4 – никотинамид, 5 – аскорбиновая кислота, 6 – никотиновая кислота, 7 – пиридоксаль, 8 – пиридоксин, 9 – пантотеновая кислота, 10 – фолиевая кислота, 11 – цианокобаламин, 12 – рибофлавин-5-фосфат, 13 – рибофлавин, 14 – биотин

ни при одном из значений рН не удастся добиться одновременного полного разрешения пиков тиамина, никотинамида, аскорбиновой и никотиновой кислот.

Различия в селективности и порядке элюирования витаминов на разных фазах связано, скорее всего, с наличием у второй группы неподвижных фаз гидрофильного эндкепинга, обеспечивающего дополнительные взаимодействия с полярными соединениями, что и приводит к несколько лучшей селективности в парах рибофлавин–рибофлавин-5-фосфат и тиамин–тиамин фосфат, а также к увеличению времени удерживания никотиновой кислоты и некоторой несимметричности пиков тиамина и никотинамида.

К сожалению, полного разделения всех исследуемых витаминов и витаминных форм не удастся достичь ни при одном из значений рН ни на одной из неподвижных фаз. Однако в реальных медицинских препаратах, премиксах, БАД и витаминизированных продуктах, как правило, витамины присутствуют только в одной из форм, поэтому в большинстве случаев можно подобрать подходящие условия для разделения присутствующих витаминов. Приемлемое разделение большинства витаминов может быть получено при разных значениях рН. Однако наилучшего разрешения удастся добиться при значении рН 1,5–1,8. Кроме того, большинство витаминов более стабильно в кислой среде. При необходимости полного разделения никотиновой и аскорбиновой кислот целесообразно использовать фазы первой группы, а при необходимости разделять пары рибофлавин–рибофлавин-5-фосфат – неподвижные фазы второй группы.

Влияние профиля градиентного элюирования

Одно из основных условий для достижения наиболее эффективного разделения веществ – выбор оптимального градиентного режима. Используя различные градиентные профили, можно добиться хорошего разрешения хроматографических пиков веществ, имеющих близкие значения времени удерживания, а также существенно снизить общее время проведения анализа.

При варьировании условий градиентного элюирования изменяли начальную концентрацию ацетонитрила, продолжительность начального изократического участка, скорость увеличения концентрации ацетонитрила, конечную концентрацию ацетонитрила, продолжительность элюирования. В конце каждого хроматографического определения на короткое время увеличивали концентрацию ацетонитрила до 50% для того, чтобы элюировать сильноудерживаемые примеси с колонки. После каждого градиентного элюирования хроматографическую систему уравнивали при исходных условиях в течение 6 мин. Исследованные градиентные профили приведены в табл. 1.

При подборе оптимальных условий градиентного элюирования в качестве тестовой смеси использовали стандартную смесь витаминов. Для всех экспериментов в качестве компонентов подвижной фазы применяли 0,6%-ю фосфорную кислоту с рН 1,76 и ацетонитрил. В ряде работ и методик [1, 2], посвященных определению витаминов, начальный этап градиентного элюирования осуществляется при ненулевом содержании ацетонитрила. По-видимому, это

связано с тем, что некоторые колонки при работе в 100%-й водной среде теряют свои свойства из-за так называемого коллапса C18-групп. При подборе оптимальных условий разделения варьировали начальное содержание ацетонитрила в подвижной фазе. Установлено, что наилучшего разделения слабоудерживаемых соединений удается достичь при нулевом содержании ацетонитрила. Увеличение содержания ацетонитрила приводит к снижению времени удерживания и к ухудшению разрешения между пиками соседних соединений. Явление коллапса C18-групп для использованных колонок не наблюдали.

Лучшим градиентным режимом для разделения водорастворимых витаминов оказался градиент № 1. Его использование позволило получить не только хорошее разрешение эффективности и симметричные формы пиков анализируемых веществ, но и достаточно равномерную селективность определения витаминов в диапазоне от 3 до 25 мин.

Влияние температуры

Выбор и поддержание оптимальной температуры колонки важно для успешного разделения и определения анализируемых веществ. Известно, что процесс сорбции соединения на используемой неподвижной фазе является экзотермическим, поэтому изменение температуры колонки в той или иной мере влияет на равновесие данного процесса. Это приводит к изменению времени удерживания анализируемых соединений и эффективности их хроматографических пиков.

Для исследования влияния температуры мы провели серию экспериментов при значениях температуры термостата колонки от 20 до 60°C включительно с шагом в 10°C. Верхний предел выбирался из соображений стабильности неподвижной фазы. Все эксперименты проводили в градиентном режиме № 1.

Как и предполагалось, с увеличением температуры наблюдается уменьшение времени удерживания соединений. Однако существенного снижения времени удерживания добиться не удалось, максимальное изменение при переходе от 20 к 60°C составляло 1,5–2 мин для всех витаминов. Уменьшение времени удерживания для разных витаминов происходит практически синхронно, поэтому варьирование только температуры хроматографической колонки не позволяет улучшить разделение. Кроме того, выяснилось, что повышение температуры приводит к увеличению флуктуации базовой линии, поэтому все дальнейшие эксперименты проводили при температуре 20°C.

Таким образом, оптимальными для разделения витаминов являются следующие условия: градиентный профиль № 1; элюент А – 0,6%-я фосфорная кислота (рН 1,70); элюент В – ацетонитрил; температура колонки 20°C. Для разделения никотиновой и аскорбиновой кислот следует использовать колонки “Luna C18(2)” или “Gemini C18”, а при необходимости разделять пары рибофлавин–рибофлавин-5-фосфат и тиамин–тиамин фосфат – неподвижные фазы “Synergi Hydro C18” или “Zorbax SB-C18”. Хроматограмма модельной смеси витаминов в выбранных условиях представлена на рис. 3.

Выбор условий детектирования

Спектры поглощения каждого из витаминов регистрировали с помощью детектора на диодной матрице. Значения максимумов поглощения витаминов при рН 1,7 приведены в табл. 2. Количественное определение каждого витамина следует проводить при длинах волн, позволяющих добиться наилучших пределов обнаружения и достаточного разрешения между пиком определяемого витамина и соседними пиками. Для ряда реальных объектов оптимальные длины волн могли не совпадать с максимумами поглощения. Это связано с собственным поглощением компонентов матрицы анализируемого образца. При оптимизации условий определения идентификацию пиков витаминов на полученных хроматограммах проводили с помощью предварительно записанной библиотеки спектров. Пределы обнаружения, диапазоны линейности и использованные длины волн детектирования приведены в табл. 2.

Анализ реальных образцов

В предложенных условиях мы провели анализы медицинского витаминного препарата “Ундевит”, БАД “Алфавит”, витаминного премикса “GS-vit 12”. Для извлечения витаминов из исследуемых объектов использовали 1%-й раствор фосфорной кислоты (рН 1,5). Экстракцию витаминов из исследуемых объектов проводили в ультразвуковой бане. Точную навеску анализируемого образца помещали в стеклянную колбу емкостью 250 мл, заливали экстрагентом и помещали в ультразвуковую ванну. Величину навески препарата рассчитывали таким образом, чтобы получившиеся концентрации для всех определяемых витаминов попадали в диапазон определяемых концентраций. Для проведения анализа препаратов в форме таблеток необходимо предварительно отобрать 10–20 таб-

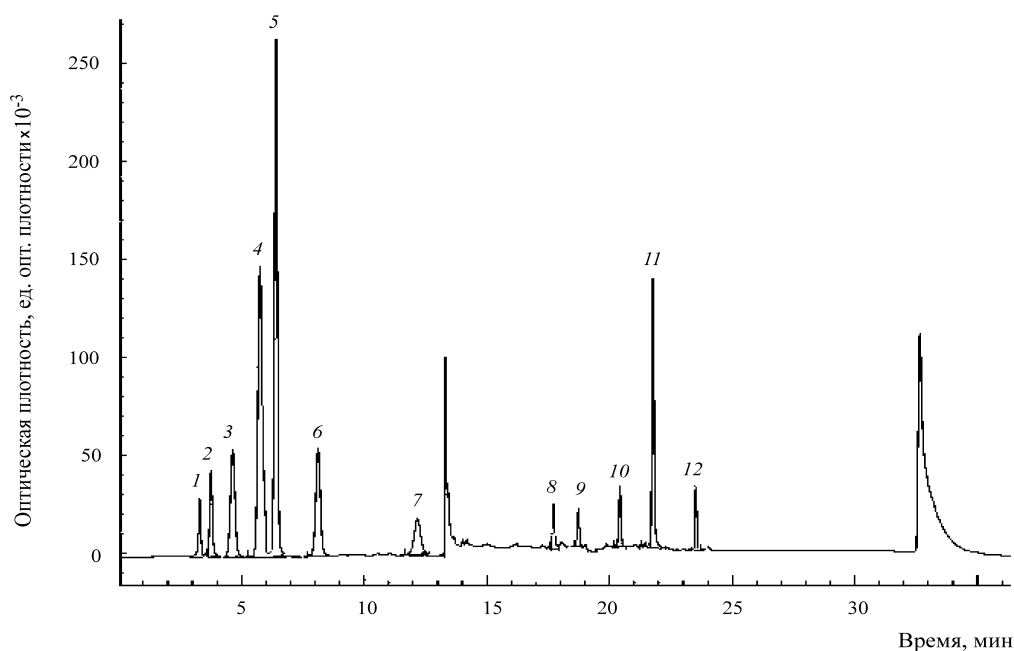


Рис. 3. Хроматограмма стандартного раствора витаминов. Колонка “Luna C18 (2)” 250x4.6 мм. Градиент № 1 (см. в тексте). СФ-детектирование: 0–3,2 мин 292 нм, 3,2–7 мин 254 нм, 7–13 мин 292 нм, 13–18 мин 200 нм, 18–20 мин 297 нм, 20–21 мин 360 нм, 21–22,5 мин 270 нм, 23–24 мин 200 нм. Витамины: 1 – пиридоксамин, 2 – тиамин, 3 – никотинамид, 4 – никотиновая кислота, 5 – аскорбиновая кислота, 6 – пиридоксаль, 7 – пиридоксин, 8 – пантотеновая кислота, 9 – фолиевая кислота, 10 – цианокоболамин, 11 – рибофлавин, 12 – биотин

Т а б л и ц а 2

Длина волны детектирования и метрологические характеристики определения витаминов

Витамин	Длина волны, нм	Предел обнаружения, мг/л	Диапазон линейности, мг/л
Тиамин	244	0,01	0,01–100
Тиамин фосфат	244	0,02	0,02–100
Никотинамид	244	0,03	0,03–300
Никотиновая кислота	244	0,2	0,2–200
Аскорбиновая кислота	254	0,03	0,03–200
Пиридоксин	292	0,02	0,02–100
Пиридоксаль	292	0,1	0,1–100
Пиридоксамин	292	0,3	0,3–100
Пантотеновая кислота	200	0,2	0,2–200
Фолиевая кислота	297	0,006	0,006–100
Цианокоболамин	360	0,2	0,2–100
Рибофлавин-фосфат	270	0,2	0,2–50
Рибофлавин	270	0,005	0,005–10
Биотин	200	0,2	0,2–100

леток, взвесить их, а затем тщательно растереть в фарфоровой ступке. При дальнейших расчетах содержание витаминов приводится по отношению к массе,

эквивалентной одной таблетке. Данные по измеренному и паспортному содержанию витаминов в исследуемых препаратах приведены в табл. 3. Как видно,

Таблица 3

Определение содержания витаминов в реальных объектах ($n = 3, p = 0,95$)

Витамин	Анализируемые объекты					
	«Ундевит»		«Алфавит»		Премикс «GS-vit 12»	
	паспорт, мг/драже	найдено, мг/драже	паспорт, мг/таблетку	найдено, мг/таблетку	паспорт, г/100г	найдено, г/100г
Тиамин	2	1,9±0,1	1,5	1,4±0,1	0,46–0,54	0,49±0,02
Никотинамид	20	19±1	20	20±1	3,7–4,3	4,0±0,2
Аскорбиновая кислота	75	73±3	80	78±3	56–64	62±2
Пиридоксин	3	3,1±0,1	1	1,0±0,05	0,54–0,66	0,61±0,03
Пантотеновая кислота	3	3,0±0,1	5	5,0±0,2	2,8–3,2	3,2±0,2
Фолиевая кислота	0,07	0,071±0,003	0,2	0,20±0,01	0,045–0,055	0,045±0,003
Рибофлавин	2	2,0±0,1	1,7	1,6±0,1	0,74–0,86	0,81±0,02

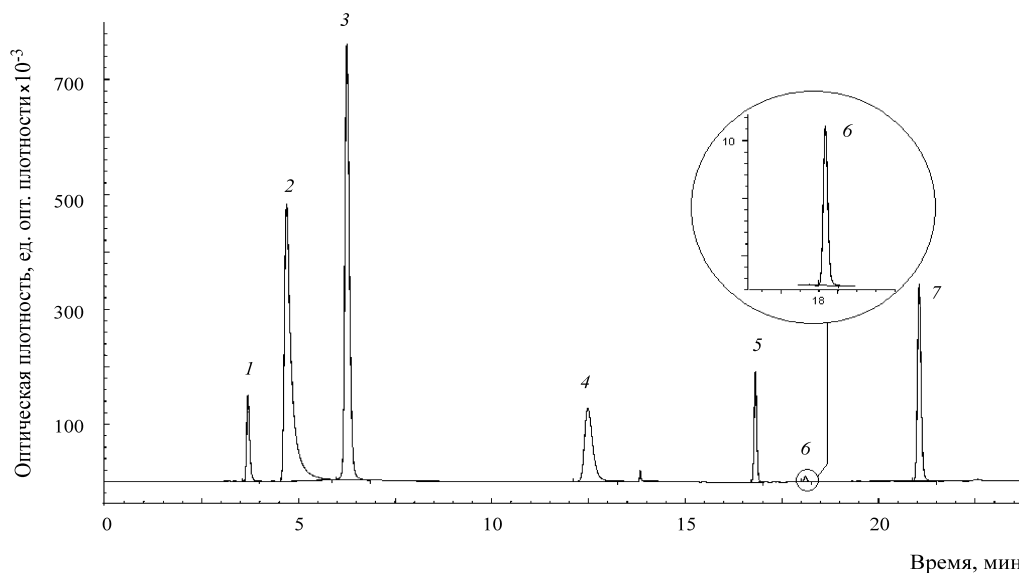


Рис. 4. Хроматограмма экстракта драже «Ундевит». Колонка «Synergi Hydro» 250×4,6 мм, градиент № 1 (см. в тексте), СФ детектирование см. рис. 3. Витамины: 1 – тиамин, 2 – никотинамид, 3 – аскорбиновая кислота, 4 – пиридоксин, 5 – пантотеновая кислота, 6 – фолиевая кислота, 7 – рибофлавин

полученные результаты хорошо согласуются с паспортными данными. К сожалению, не удалось провести определения цианокоболамина и биотина в исследуемых препаратах, поскольку содержание этих витаминов оказалось ниже предела обнаружения используемого детектора. Хроматограмма экстракта драже «Ундевит» приведена на рис. 4.

Выводы

Изучено влияние pH, температуры, неподвижной фазы на удерживание и разделение витаминов. Установлено, что отличия в удерживании витаминов на раз-

ных неподвижных фазах связаны, по-видимому, с наличием различных эндкепирующих групп и разной плотностью прививки C18-групп. Наилучшего разделения витаминов и витаминных форм удалось достигнуть при pH подвижной фазы 1,5–1,8. Влияние температуры на удерживание витаминов незначительно. Предложены хроматографические условия, позволяющие разделять 12 водорастворимых витаминов и витаминных форм: элюент А – 0,6%-я фосфорная кислота, pH 1,7; элюент Б – ацетонитрил; градиентный профиль: 0–6 мин – 0% Б, 6–15 мин – от 0 до 18% Б, 15–28 мин – 18% Б, 28–29 мин – от 18 до 50% Б, 29–30 мин – от

50 до 15% Б, 30–31 мин – от 15 до 0% Б, скорость потока элюента 0,8 мл/мин, температура колонки 20°C. Для разделения никотиновой и аскорбиновой кислот следует использовать колонки “Luna C18(2)” или “Gemini C18”, а при необходимости разделять

пары рибофлавин–рибофлавин-5-фосфат и тиамин–тиамин фосфат – неподвижные фазы “Synergi Hydro C18” или “Zorbax SB-C18”. Подобранные условия использованы при определении витаминов в коммерческих образцах витаминных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eitenmiller R.R., Ye L., Landen W.O. Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. Boca Raton. N.Y., 2008.
2. Zemleni J., Rucker R.B., McCormick D.B., Suttie J.W. Handbook of Vitamins. N.Y., 2007.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. М., 2008.
4. Marszaii M.L., Lebedzicka A., Czarnowski W., Szefer P. // J. Chromatogr. A. 2005. **1094**. P. 91.
5. Amin M., Reusch J. // Analyst. 1987. **112**. P. 989.
6. Woollard D.C., Indyk H.E. // J. AOAC Int. 2002. **85**. P. 945.
7. Llorenc M.P., Capella-Peiry M.E., Gil-Agusti M., Esteve-Romero J. // J. Chromatogr. A. 2003. **984**. P. 223.
8. Li K. // Biomed. Chromatogr. 2002. **16**. P. 504.
9. Amiduic B., Brboric J., Kudina O., Vladimirov S. // J. Serb. Chem. Soc. 2005. **70**. P. 1229.
10. Li Y., Brown P.R. // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2003. **26**. P. 1769.
11. Li H.B., Chen F. // J. Sep. Sci. 2001. **24**. P. 271.
12. Heudi O., Kilinc T., Fontannaz P. // J. Chromatogr. A. 2005. **1070**. P. 49.
13. Moreno P., Salvado P. // J. Chromatogr., A. 2000. **870**. P. 207.
14. Klejdus B., Petrlova J., Potechil D., Adam V., Mikelova R., Vacek J., Kizek R., Kubam V. // Anal. Chim. Acta. 2004. **520**. P. 57.
15. Albala-Hurtado S., Veciana-Nogues M.T., Izquierdo-Pulido N., Marine-Font A. // J. Chromatogr. A. 1997. **778**. P. 247.
16. Maeda Y., Yamamoto M., Owada K., Sato S., Masui T., Nakazawa H. // J. AOAC Int. 1989. **72**. P. 244.
17. Ekinci R., Kadakal Z. // Acta Chromatographica. 2005. **15**. P. 289.
18. Lebedzicka A., Marszaii M.L., Kuta J., Szefer P. // J. Chromatogr., A. 2007. **1173**. P. 71.
19. Dawson K.R., Unklesbay N.F., Hedrick H.B. // J. Agric. Food Chem. 1988. **36**. P. 1176.
20. Wehling R.L., Wetzel D.L. // J. Agric. Food Chem. 1984. **32**. P. 1326.
21. Zafrá-Gomez A., Garbalo A., Morales J.C., Garcia-Ayuso L.E. // J. Agric. Food Chem. 2006. **54**. P. 4531.
22. Presoto A.E.F., Rios M.D.G., De Almeida-Muradian L.B. // J. Braz. Chem. Soc. 2004. **15**. P. 136.

Поступила в редакцию 07.09.09

DETERMINATION OF WATER SOLUBLE VITAMINS IN VITAMIN PREMIXES, BIOLOGICALLY ACTIVE DIETARY SUPPLEMENTS AND PHARMACEUTICAL PREPARATION BY HPLC WITH GRADIENT ELUTION

A.A. Bendryshev, E.B. Pashkova, A.V. Pirogov, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry)

Influence of the pH of the mobile phase and temperature on the chromatographic separation of 14 vitamins and vitameric forms on four different stationary phases was investigated. The chromatographic parameters for simultaneous determination of 12 vitamins and vitameric forms were suggested. The best separation was achieved under the following conditions: gradient elution mode, pH of eluent A (0,6% phosphoric acid) 1,5–1,8; eluent B – acetonitrile. In order to separate nicotinic and ascorbic acid, stationary phases Luna C18(2) and Gemini C18, and to separate riboflavin and riboflavin-5'-phosphate correspondently – stationary phases Synergi Hydro RP and Zorbax SB-C18 are more preferable. The suggested technique was applied for the determination of vitamins in commercial samples of multivitamin pharmaceuticals and premixes. The obtained results were in good conclusion with passport data.

Key words: HPLC, chromatography, vitamins, determination, premixes, supplements, pharmaceutical preparation.

Сведения об авторах: Бендрышев Александр Александрович – мл. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (e-mail zhab@mail.ru); Пашкова Елена Борисовна – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ ((495) 939-46-87); Пировов Андрей Владимирович – вед. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (495) 939-46-87; Шпигун Олег Алексеевич – профессор химического факультета МГУ, чл.-корр. РАН, докт. хим. наук (shpigun@analyt.chem.msu.ru).