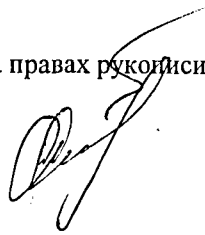


На правах рукописи



СИРИЦО Светлана Игоревна

**ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ИЗОКРАТИЧЕСКАЯ ВЭЖХ ДЛЯ
АНАЛИТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ
ВИТАМИНОВ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ РЕЦЕПТУРАХ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Москва
2008

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Новомосковского института Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева

Научный руководитель: кандидат химических наук,
доцент Филимонов В.Н.

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор О.М. Петрухин
доктор химических наук,
профессор В.Ф. Селеменев

Ведущая организация: Белгородский государственный техноло-
гический университет им. В.Г. Шухова

Защита состоится 15 января 2009г. на заседании диссертационного совета Д 212.204.07 в РХТУ им. Д. И. Менделеева (125190 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-информационном центре РХТУ имени Д.И.Менделеева.

Автореферат диссертации разослан 1 декабря 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета Д 212.204.07,

к.х.н.

Сенаторова С.В.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Витамины – низкомолекулярные биологически активные органические соединения различной химической природы, необходимые в небольших количествах организму для нормального функционирования и роста, сопротивляемости инфекциям, синтеза белков и жиров. По растворимости подразделяются на жирорастворимые и водорастворимые (ВРВ). Последние представлены широким рядом представителей, сильно различающихся по своим физико-химическим свойствам и относящихся к разным классам соединений – витамин С, витамины группы В: тиамин (В₁), рибофлавин (В₂), никотиновая кислота (ниацин, РР), амид никотиновой кислоты (ниацинамид, РРамид), пиридоксин (В₆), фолиевая кислота (Вс), цианкобаламин (В₁₂). Дефицит витаминов провоцирует возникновение авитаминозов, изменение физиологических процессов в организме, предотвращение которых возможно посредством применения фармацевтических рецептур, содержащих синтетические витамины.

Увеличивающаяся активность выпуска поливитаминных препаратов фармацевтическими предприятиями Белгородского региона требует проведения контроля их аутентичности и качества. Однако, методики качественного и количественного их анализа, рекомендуемые в настоящее время нормативно-техническими документами, основаны главным образом на методах спектрофотометрии. Эти методы не достаточно селективны, трудоемки и требуют больших затрат времени, связанного с предварительным выделением компонентов, входящих в состав препаратов и наличием большого числа вспомогательных операций, при подготовке пробы к анализу. Поэтому актуальной задачей аналитической химии витаминов является разработка экспрессных и высокоточных методик количественного определения содержания ВРВ в многокомпонентных смесях.

Эффективным способом решения данной проблемы может стать применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), которая характеризуется высокой чувствительностью, селективностью, разрешающей способностью и быстротой получения конечных результатов. Растворимость ВРВ в полярных растворителях обуславливает целесообразность решения подобных аналитических задач в рамках обращено-фазовой (ОФ) ВЭЖХ. В практической деятельности аналитических служб предприятий Белгородского региона методики с применением данного варианта ВЭЖХ не нашли широкого распространения, что связано с необходимостью использования: высокоэффективных дорогостоящих сорбентов; многокомпонентных подвижных фаз с токсичными модификаторами (например, метанолом), требующих дополнительных лицензий для работы; детектирующих систем (например, диодно-матричных), ограниченно применяемых в настоящее время.

Кроме этого, для достижения эффективного разделения смесей ВРВ, различающихся по химическим свойствам, как правило, предлагается применение градиентного режима элюирования, который, характеризуется (по сравнению с изократическим) меньшей воспроизводимостью коли-

чественных характеристик пиков, более высоким уровнем «шумов», увеличением длительности и стоимости серийных анализов, а также дополнительными расходами на реактивы и оборудование. В связи с этим применение градиентного режима не всегда целесообразно, а возможности разделения смеси ВРВ при фотометрическом детектировании в изократическом режиме элюирования до конца не выявлены.

Цель работы – разработка экспрессных методик количественного контроля содержания водорастворимых витаминов в многокомпонентных фармацевтических рецептурах на основе изократической обращено-фазовой ВЭЖХ, реализуемых на доступном отечественном хроматографическом оборудовании с фотометрическим детектированием.

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

1. проведение систематических исследований хроматографического поведения водорастворимых витаминов на сорбентах нерегулированной формы в различных вариантах обращено-фазовой ВЭЖХ при изократическом режиме элюирования водосодержащими бинарными подвижными фазами;
2. выбор модели адекватно описывающей удерживание водорастворимых витаминов в варианте ОФ ВЭЖХ;
3. разработка схемы анализа водорастворимых витаминов в многокомпонентных фармацевтических рецептурах.

Работа выполнена в соответствии с Координационным планом Научного Совета РАН по адсорбции и хроматографии на 2005 – 2009 г.г. Секция «Ионообменное хроматографирование», тема «Высокоэффективная жидкостная хроматография, высокоэффективная ионная хроматография биологически активных веществ», код 2.15.11.4x70.

Научная новизна. Систематизированы и обобщены результаты исследования хроматографического поведения витаминов: С, В₁, В₂, В₆, В₁₂, В_с, РР, РРамид алкильными сорбентами нерегулированной формы при изократическом элюировании бинарными водосодержащими подвижными фазами в режиме ОФ и ион-парной ОФ ВЭЖХ.

В рамках полуэмперического метода установлено распределение электронной плотности в молекулах ВРВ, рассчитаны энергии их взаимодействия с неподвижной фазой и водой. Проведена оценка гидрофобности водорастворимых витаминов с помощью критериев Шатца (H) и Гангач-Лео ($\log P$) и сопоставление их с энергиями взаимодействия «витамин - Silasorb C₁₈», «витамин-вода», параметрами удерживания аналитов.

Показана перспективность применения уравнения универсальной квазихимической модели для оценки роли межмолекулярных взаимодействий водорастворимых витаминов в ОФ ВЭЖХ.

Впервые опробовано и рекомендовано в качестве ион-парного реагента применение четвертичных фосфониевых соединений для разделения смеси ВРВ в ходе комплексного исследования влияния состава подвижной фазы в варианте ион-парной (ИП) обращено-фазовой ВЭЖХ.

Обосновано применение многомерного хроматографирования, сочетающего варианты ОФ и ион-парной ОФ ВЭЖХ для эффективного разделения полного набора смеси исследуемых ВРВ.

Практическая значимость. На основании комплексного исследования хроматографического поведения водорастворимых витаминов в обращено фазовой и ион-парной ОФ ВЭЖХ:

- разработана схема рационального выбора состава подвижной фазы, исходя из априорной информации об анализируемом объекте;
- оптимизирован режим работы схемы многомерного хроматографирования;
- разработаны экспрессные методики количественного контроля содержания водорастворимых витаминов, реализуемые на отечественных хроматографах с фотометрическим детектором при многомерном хроматографировании в изократическом режиме. Методики прошли промышленную апробацию на предприятиях г. Белгорода.

Установленные в работе закономерности хроматографического поведения ВРВ в условиях ОФ и ИП ОФ ВЭЖХ при изократическом элюировании сорбатов могут быть включены в хроматографические базы данных и использованы при разработке методов аналитического контроля водорастворимых витаминов в продуктах пищевой и косметической промышленности.

Положения, выносимые на защиту:

1. Закономерности хроматографического поведения водорастворимых витаминов на сорбентах нерегулированной формы (Silasorb C₁₈) при элюировании бинарными водосодержащими подвижными фазами.
2. Анализ роли межмолекулярных взаимодействий в удерживании ВРВ с позиции теории универсальной квазикимической модели.
3. Влияние состава (природы и концентрации ион-парного реагента, органического модификатора, рН среды) элюента на удерживание ВРВ в варианте ИП ОФ ВЭЖХ. Результаты оценки применения в качестве ион-парных реагентов четвертичных аммониевых и фосфониевых солей.
4. Многомерная техника изократического элюирования аналита, содержащего полный набор исследуемых водорастворимых витаминов.
5. Методики хроматографического определения водорастворимых витаминов в фармацевтических препаратах.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на: XI конференции «Поверхностно-активные вещества – наука и производство» (Шебекино, 2003 г.), X Межрегиональной конференции «Проблемы химии и химической технологии» (Тамбов, 2003 г.), I, II, III Всероссийской конференции «Физико-химические процессы в конденсированном состоянии и на межфазных границах «Фагран - 2002», и «Фагран – 2004» и «Фагран - 2006» (Воронеж, 2002, 2004 и 2006г.г.), V Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналити-

ка - 2003». (Санкт-Петербург, 2003 г.), VII конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Новосибирск, 2004 г.), III Международной конференции «Экстракция органических соединений «ЭОС – 2005» (Воронеж, 2005 г.), Международном симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии» (Краснодар, 2002 г.), II Международном симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2005 г.), XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003 г.), II всероссийской конференции «Аналитика России» (Краснодар, 2007 г.), II международный форум «Аналитика и аналитики» (Воронеж, 2008)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей (в том числе обзор) в периодических изданиях, рекомендованных ВАК для опубликования научных трудов и 12 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав (обзор литературы, экспериментальная часть, три главы обсуждения полученных результатов), выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, включает в себя 35 рисунков и 37 таблиц. Список литературы содержит 207 наименований работ зарубежных и отечественных авторов.

Основное содержание работы

В обзоре литературы (глава I) представлены основные физико-химические свойства водорастворимых витаминов и существующие методы их определения в различной продукции. Применяемые методы анализа не позволяют определять полный спектр ВРВ одновременно. Требуется проведение многостадийных процедур пробоподготовки, что ухудшает метрологические характеристики аналитических методик и увеличивает время анализа. Показано, что альтернативу традиционным количественным методам контроля составляют ОФ и ИП ОФ варианты ВЭЖХ. Обобщены литературные сведения о способах аналитического разделения ВРВ в этих вариантах и показаны преимущества изократического элюирования. Рассмотрены модели удерживания и факторы, влияющие на удерживание

Экспериментальная часть

Объектами исследования являлись свежеприготовленные растворы водорастворимых витаминов В₁, В₂, В₆, В₁₂, В_с, С, РР, РРамид фармакопейной чистоты.

Работа выполнена на жидкостном хроматографе «Цвет -304» (ОАО «Цвет», г. Дзержинск, Россия) с фотометрическим детектором (254нм). Разделение витаминов проведено в изократическом режиме элюирования на стальных колонках (150x4,6 мм), заполненных неподвижной фазой (НФ) нерегулированной формы Silasorb-C₁₈ (7,5 мкм, «Lachema», г.Брно, Чехия).

Подвижные фазы (ПФ) – смесь изопропанола и воды, ацетонитрила и воды (содержание органического реагента модификатора 1-50об.%), а также подвижные фазы, содержащие ион-парный реагент (бромиды тетрабутиламмония, цетильтриметиламмония и тетрадиэтиламинофосфония),

фосфат-ацетатсодержащие растворы (рН 4-9), кислотность которых регулировали добавлением кислот (фосфорная, хлороводородная, уксусная) и оснований (гидроксид натрия). Измерения проводили на рН-метре рН-673М.

В качестве меры удерживания сорбатов в хроматографических системах, отличающихся составом подвижных фаз применяли: коэффициенты емкости (k'), меры эффективности разделения – критерий R_s , отклонение профиля хроматографической зоны анализируемого вещества от формы гауссовой кривой оценивали с помощью коэффициента асимметрии A_s . Эффективное разделение компонентов пробы регистрировали при $R_s \geq 1$; $0,5 < k' < 20$; $0,7 < A_s < 1,5$.

Квантово-химические расчеты геометрического и электронного строения молекул ВРВ осуществляли на персональном компьютере в программном пакете «HyperChem 7.0» полуэмпирическим методом PM3. Оптимизацию геометрических параметров молекул проводили по алгоритму Polak–Ridber.

Гидрофобность ВРВ рассчитывали согласно: 1) критерию гидрофобности Шатца (H): $H = n_n - 4\sqrt{n_f}$, где: n_n - число углеродных атомов, n_f - число полярных групп.

2) логарифму коэффициента распределения в системе октанол – вода ($\log P$) - в программном пакете «HyperChem 7.0».

Расчет параметров молекул, их гидрофобности и энергии межмолекулярного взаимодействия

Для оценки влияния строения молекул сорбата на удерживании в условиях ОФ ВЭЖХ рассчитаны электронные и структурные параметры водорастворимых витаминов, представленные в табл.1. Сопоставление критериев гидрофобности H и $\log P$ водорастворимых витаминов показало отсутствие корреляции между ними для изучаемых анализов, что препятствует сравнительному описанию ВРВ, относящихся к разным классам. Установленные противоречия не позволяют сделать однозначный вывод о прогнозировании сродства к неполярному сорбенту всех ВРВ на основании только данных гидрофобности. Поэтому, нуждаются в дополнительной корректировке.

Таблица 1.

Критерий гидрофобности и энергии межмолекулярных взаимодействий ВРВ с неподвижной фазой $\Delta E_{(сорб)}$ и водой $\Delta E_{(в)}$

витамин	$\log P$	H	энергия взаимодействия молекул витаминов	
			с сорбентом, $\Delta E_{(сорб)}$, кДж/моль	с водой, $\Delta E_{(в)}$, кДж/моль
Гидрохлорид тиамин, B_1	-0,05	5,06	- 83	-14
Рибофлавин, B_2	-1,46	8,06	- 564	-31
Пиридоксин, B_6	-0,77	1,07	- 91	-19
Цианкобаламин, B_{12}	-	>20	- 2253	-21
Фолиевая кислота, B_9	0,36	9,2	-190	-24
Аскорбиновая кислота, C	-1,85	-2,0	- 3	-30
Никотиновая кислота, PP	0,29	0,3	-45	-25
Никотин амид, PP амид	-0,37	0,3	- 62	-21

Расчеты энергетических характеристик позволяют оценить преобладающие межмолекулярные взаимодействия в простейших системах и сопоставить их с критериями гидрофобности. Так, энергии взаимодействия молекул витаминов В₂, В_с и В₁₂ (молекулярная масса более 300 г/моль) с сорбентом характеризуются высокими значениями (по модулю) и согласуются с высокими *H* (табл. 1.). Для витаминов РРамид, РР, В₁ и В₆ характерна сопоставимость энергий взаимодействия их молекул с водой и с неподвижной фазой, что позволяет предполагать незначительное преобладание межмолекулярного взаимодействия «витамин – неподвижная фаза», которое подтверждается средними значениями *H* (согласно *H* витамины РРамид, РР, В₁ и В₆ относятся к низкогидрофобным).

Обращено-фазовая хроматография при элюировании водными и водно-органическими растворами

При элюировании ВРВ бидистиллированной водой порядок выхода сорбатов С, РР, РРам, В₆ (*k'* которых соответственно равны 2,74, 2,97, 4,39, 5,46), согласуется с уменьшением (по модулю) энергии взаимодействия их с ПФ. Отсутствие хроматографического сигнала при элюировании витаминов В₁, В₂, В₁₂, В_с (*H* > 4) связано с межмолекулярными взаимодействиями гидрофобной части молекулы с НФ, преобладание которых выявлено квантово-химическими расчетами (табл. 1). Зависимости между *logP* и *k'* для водорастворимых витаминов, относящихся к различным классам соединений, не установлено.

Влияние природы и концентрации органического модификатора. Уменьшение сродства ВРВ к сорбенту, снижение *k'*, повышение симметрии профилей хроматографических пиков могут быть достигнуты введением в водную ПФ органических модификаторов, усиливающих специфические взаимодействия «сорбат – элюент». Подобными свойствами обладают растворители, относящиеся к VI (диоксан, ацетонитрил) и II (спирты) группам в классификации Снайдера. Выполнена сравнительная оценка экспериментальных данных в рамках моделей Хорвата, Снайдера, Мураками и универсальной квазихимической вытеснительной. Наиболее достоверно полученные результаты описывает уравнение квазихимической модели, которое учитывает наряду с конкурентной сорбцией и межмолекулярные взаимодействия в объеме подвижной фазы:

$$\frac{1}{k'} = \frac{1}{\Phi K_S} \left(1 + \frac{K_{SM} M_m}{L} \right) \left[1 + (K_m - 1) M_m - \frac{K_{SM} S_m M_m}{L^2} - \frac{K_{MM} M_m (1 - L^2)}{L^2} \right], \quad (1)$$

где *S_m*, *L*, *M_m* – мольные доли сорбата (S), наименее (L) и наиболее (*M_m*) сорбционно-активного компонента подвижной фазы (*m*); *K_S*, *K_M*, *K_{SM}*, *K_{MM}* – константы равновесий квазихимических реакций сорбции и ассоциации сорбата и модификатора; Φ – фазовое отношение хроматографической колонки.

Преобразование уравнения (1) позволило получить полиномиальные уравнения первой, второй и третьей степени, характеризующие доминирующие межмолекулярные взаимодействия в

хроматографической системе. Установлено, что вне зависимости от природы модификатора, удерживание витаминов адекватно описывается полиномами второй степени

$$\frac{1}{k'} = a_0 + a_1 M_m + a_2 M_m^2, \text{ учитывающими взаимодействия сорбат-сорбент, модификатор-сорбат,}$$

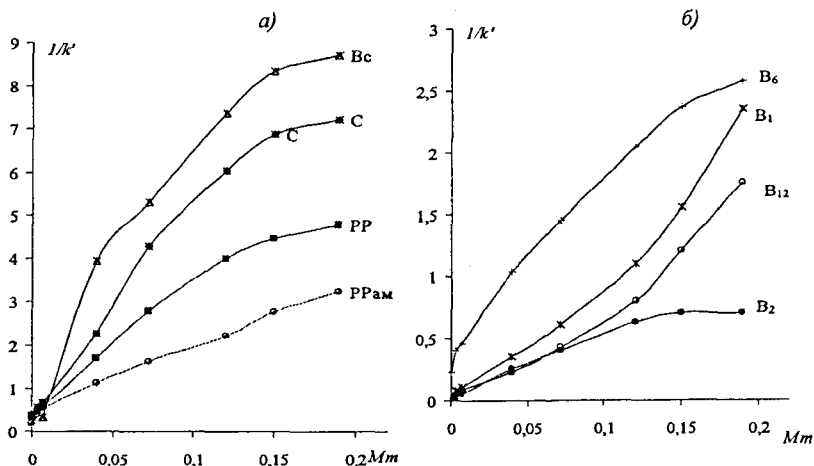


Рис. 1. Зависимость $1/k'$ водорастворимых витаминов (а, б) от мольной доли (M_m) изопропилового спирта в ПФ

модификатор-сорбент.

На рис. 1 и 2 приведены графические зависимости $1/k' = f(M_m)$ при элюировании подвижными

фазами состава «вода - изопропанол» и «вода - ацетонитрил». Введение в водную ПФ изопропанола (II группа) вызывает формирование кривых различного наклона (рис.1). Кривые зависимости $1/k' = f(M_m)$ при элюировании ПФ с добавками ацетонитрила (VI группа классификации Снайдера), характеризуются преимущественно выпуклым наклоном для всех сорбатов (рис. 2). При содержании ацетонитрила не более 0,0264 мол. долей, преобладают взаимодействия сорбат - сорбент, вызывающие формирование размытых профилей пиков витаминов

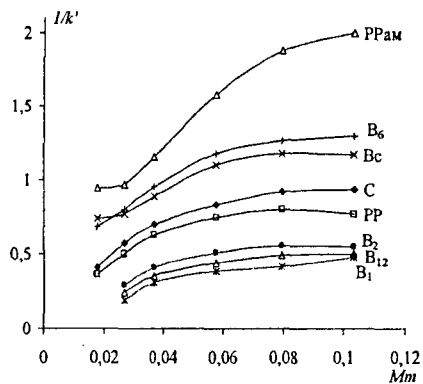


Рис. 2. Зависимость $1/k'$ от мольной доли (M_m) ацетонитрила в ПФ

и отсутствием хроматографического сигнала витаминов В₁, В₁₂ и В₂ ($H > 4$). Нелинейные зависимости (рис. 2), имеющие выпуклый характер, свидетельствуют об усилении межмолекулярных взаимодействий и образовании ассоциатов между молекулами модификатора при увеличении его содержания (более 0,026 моль. долей) в ПФ. О преобладании межмолекулярных взаимодействий модификатор – модификатор в объеме ПФ при содержании изопропанола в ПФ более 0,1 мол. долей свидетельствует формирование выпуклой кривой $1/k' = f(M_m)$ для витаминов В₂, С, РР, В_с и В₆ (рис. 1).

Вогнутых кривые $1/k' = f(M_m)$ для витаминов В₁₂ и В₁ (рис. 1б) характеризуют усиление межмолекулярных специфических взаимодействий сорбат – модификатор при возрастании органического модификатора в бинарном элюенте; взаимодействия между молекулами изопропанола проявляются слабо. Образование ассоциатов между молекулами модификатора и сорбата приводит к интенсивному уменьшению удерживания витаминов В₁₂ и В₁.

Хроматографическая система с изопропанолом в качестве модификатора ПФ не обеспечивает условия эффективного разделения смеси всех ВРВ. Регистрируются качественные разрешения ($R_s > 1$) отдельных комбинаций аналитов. Хроматографическая система с водно-ацетонитрильным элюентом показала меньшую селективность разделения смеси водорастворимых витаминов. Таким образом, определяющую роль в удерживании полярных ВРВ играют межмолекулярные взаимодействия сорбата в объеме ПФ. Эти взаимодействия для полярных молекул витаминов С, РРамид, РР, В₆ ($H < 4$), максимальны и значительно уменьшают их удерживание сорбентом.

Влияние кислотности и ионной силы элюента. Способность к ионизации в водных растворах позволяет изменять характер удерживания водорастворимых витаминов варьированием рН и ионной силы элюента.

Увеличение рН водной ПФ вызывает уменьшение удерживания витаминов С, РР и РРамид (табл. 2). Наилучшее разделение витаминов С, РРамид, РР и В₆ достигается при рН элюента, равном 5. Изменение рН не влияет на удерживание витаминов более сложной структуры: В_с, В₂ и В₁₂. Они удерживаются сорбентом практически необратимо за счет многочисленных дисперсионных взаимодействий неполярных функциональных групп сорбатов с сорбентом.

Таблица 2

Хроматографические параметры ВРВ

Элюент	Время удерживания, t_R					Коэффициент асимметрии, A_s				
	В ₆	В ₁	С	РР _{амид}	РР	В ₆	В ₁	С	РР _{амид}	РР
рН 4,0	5,41	∞	3,42	8,85		1,94	–	1,29	1,29	–
рН 5,0	8,49	∞	2,75	10,02	4,87	1,39	–	1,40	3,24	5,61
рН 6,0	7,60	∞	2,54	9,13	2,87	2,17	–	1,28	1,50	1,50
рН 8,65	6,99	6,98	2,58	8,71	3,00	2,72	1,62	2,0	1,88	1,61
ФБ с рН 8,65	5,49	16,32	2,30	11,81	2,60	1,43	1,59	1,43	1,88	1,54
Ас (рН 8,65)	5,37	7,37	3,89	6,40	8,50	1,30	1,58	1,20	1,11	1,40

Для элюентов на основе фосфатных и ацетатных буферных растворов, характерно уменьшение параметров удерживания витаминов С и РР, при этом максимальное удерживание регистрируется при $pH \approx pK_a$ (рис. 3).

Тенденция увеличения удерживания витаминов В₁, В₆ с ростом pH элюента сохраняется при элюировании как ПФ с ацетат-ионами (рис.3 а), так и с фосфат-ионами (рис.3 б). При этом, более низкие k' для ПФ с фосфат-ионами, вызваны, вероятно, большей ионной силой элюента.

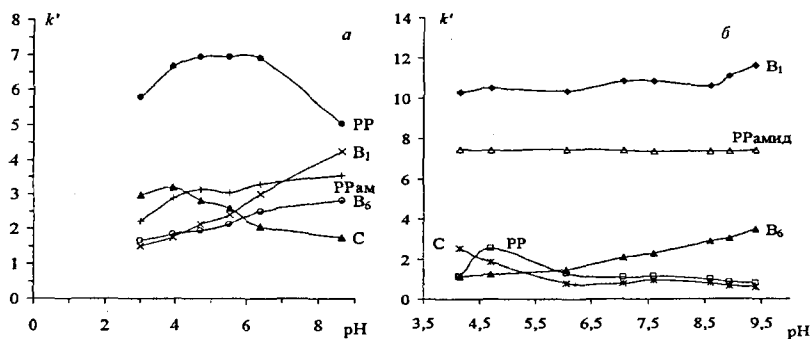


Рис. 3. Влияние pH элюента на коэффициент емкости водорастворимых витаминов в присутствии а) ацетат-ионов; б) фосфат-ионов.

Изменение ионной силы и pH элюента позволяет разделить смеси витаминов С, В₆, РРамид и В₁ (значения R_s для пар С/В₆; В₆/РРам; РРам/В₁ соответственно равны 2,08; 3,45; 2,15). Отсутствие хроматографических сигналов витаминов В₁₂, В₂, В_с, обладающих более разветвленной структурой с большими молекулярными массами, свидетельствует о преобладании роли неспецифических взаимодействий с неполярным сорбентом. Уменьшение удерживания этой группы витаминов возможно при усилении роли специфических межмолекулярных взаимодействий с модифицированным элюентом.

Совместное влияние кислотности и концентрации органического модификатора на удерживание витаминов. Применение в качестве ПФ водных растворов как с добавками ацетонитрила, так и с ацетат-ионами, не перспективно, из-за установленной низкой селективности хроматографических систем, в состав которых они входят. Поэтому не целесообразно проведение дополнительного исследования элюентов, одновременно содержащих эти компоненты. Введение ацетонитрила в ПФ с фосфат-ионами сопровождается образованием осадка.

Увеличение концентрации изопропанола в ПФ с введенными фосфат-ионами, характеризуется уменьшением удерживания витаминов (рис. 4). При этом для витаминов В₆, С, РРам, РР установлено формирование выпуклых кривых $1/k' = f(M_m)$, что свидетельствует об образовании устойчивых ассоциатов между молекулами модификатора. Вогнутые кривые $1/k' = f(M_m)$ для витаминов

V_s и V_1 — об образовании комплексов между молекулами модификатора и витаминов.

Элюирование фазой, содержащей изопропанола свыше 0,008 мол. долей (более 0,4 моль/л) сопровождалось потерей селективности разделения витаминов ($R_s \ll 1$). Не линейные зависимости, в соответствии с универсальной квазихимической моделью, свидетельствуют о соизмеримости вклада специфических взаимодействий молекул витаминов с молекулами ПФ и неспецифических взаимодействий молекул сорбатов с гидрофобной поверхностью НФ.

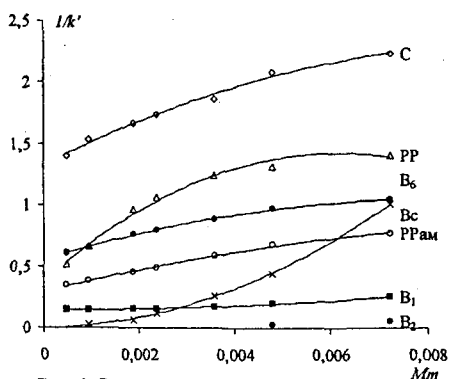


Рис. 4. Зависимость коэффициентов емкости от мольной доли (менее 0,007 мол. дол) изопропанола в фосфатном буферном растворе с pH 8,65

Таким образом, удерживание ВРВ определяется пространственным строением их молекул, числом возможных точек контакта с поверхностными сорбционными центрами, влиянием природы функциональных групп ВРВ на характер сорбции, и на возникающие межмолекулярные взаимодействия. Элюирование водно-спиртовыми ПФ, проявляющими протон-донорно-акцепторные свойства, позволяет осуществлять разделение только витаминов B_c , V_1 , V_{12} , V_2 . Введение буферных растворов, вызывающих ионизацию витаминов С, РР, РРамид, B_6 , приводит к увеличению R_s и селективности разделения. Варьирование концентрации изопропанола в элюенте позволило выбрать

оптимальный состав ПФ (фосфатный буферный раствор с 0,4 об.% изопропанола (или 0,001 мол. дол.), обеспечивающий эффективное разделение пятикомпонентной смеси витаминов: С, РРамид, B_6 , V_1 , B_c . Хроматографические параметры витаминов С, B_6 , РРамид, V_1 близки к оптимальным (k' соответственно равны 0,72, 1,72, 3,21, 7,86 и R_s для пар С/ B_6 =1,33; B_6 /РРамид=0,97; РРамид/ V_1 =1,72).

Ион-парная обращено-фазовая хроматография витаминов

Наибольшую эффективность разделения ВРВ (по проведенным предварительным исследованиям в режиме ИП ОФ ВЭЖХ) обеспечивает хроматографическая система с содержанием модификатора (изопропанола) в ПФ 0,606.% и pH подвижной фазы 8,65. В этих условиях достигается частичное разделение ВРВ.

Влияние природы и концентрации ион-парных реагентов. Сравнение влияния четвертичных фосфониевых и аммониевых соединений на удерживание аналигов осуществляли при добавлении в ПФ 1,5 мМ растворов бромидов тетрабутиламмония (БТБА), цетилтриметиламмония (БЦТМА) и тетрадиэтиламинофосфония (БТДАФ).

Хроматографическая система с БТБА, характеризуется относительно слабым удерживанием ВРВ и отсутствием хроматографического сигнала для витаминов В₂ и В₁₂.

Элюирование ПФ с более гидрофобным БЦГМА сопровождается слабым удерживанием катионных и нейтральных форм витаминов группы В и РРамид и ростом k' для анионных форм С, РР, В_с. При этом В_с сорбируется практически необратимо.

Введение в подвижную фазу БТДАФ позволяет регистрировать хроматографический сигнал всех витаминов; с ростом концентрации ИПР (рис. 5) удерживание витаминов кислотного характера и витамина В_с возрастает за счет образования ионной пары. Зависимость k' витаминов от концентрации БТДАФ проходит через максимум и для гидрофобного В_с.

Максимальное удерживание витаминов В₁₂, В₂, В₁, присутствующих в виде катионов, наблюдается при наименьшем содержании БТДАФ, так как удерживание сорбатов, по-видимому, осуществляется за счет конкурентной сорбции гидрофобной части молекулы сорбата и ИПР. Увеличение концентрации ТДАФ⁺ в ПФ вероятно приводит к формированию на поверхности НФ однородного положительного заряда. Удерживание катионных и нейтральных форм витаминов группы В уменьшается (рис. 5 б).

Оптимальная концентрация БТДАФ находится в пределах 5 – 8 ммоль/л. Значения R_s вита-

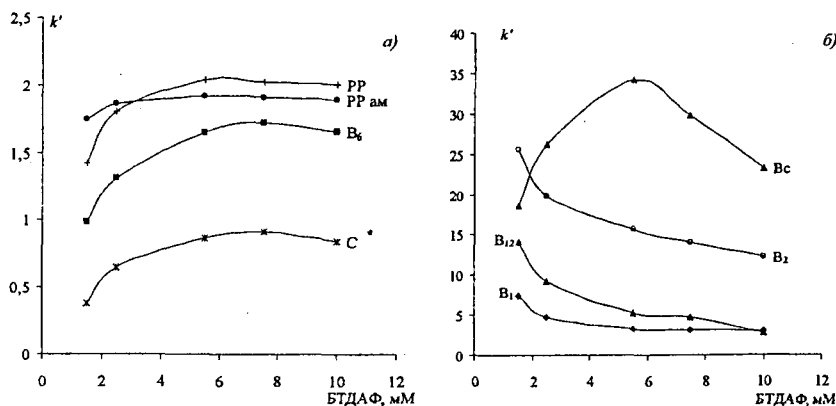


Рис. 5. Влияние концентрации добавленного БТДАФ на коэффициент емкости ВРВ.

Элюент: (1,5÷10)мМ БТДАФ в ФБ (рН 8,65) : 0,6 об.% изопропиловый спирт.

минов максимально приближены к оптимальным при концентрации БТДАФ 7,5 ммоль/л. Элюент состава 7,5 мМ БТДАФ в ФБ с рН 8,65 : 0,6 об.% изопропанол может быть применен для разделения и дифференциального определения как витаминов группы В, так и некоторых ВРВ кислотного характера.

Схемы выбора оптимального состава. Проведенные исследования позволили рекомендовать схему выбора состава подвижной фазы по априорной информации о составе анализируемой сме-

си. Предлагаемая схема (рис. 6) позволяет выбрать состав элюента, обеспечиваю ий наилучшее разделение смеси витаминов.

В случае одновременного присутствия в анализируемом объекте всех ВРВ для их разделения можно рекомендовать многомерное хроматографирование. Вариант схемы подключения колонок представлен на рис.7. Предлагаемая схема включает две колонки б' и 7', заполненные

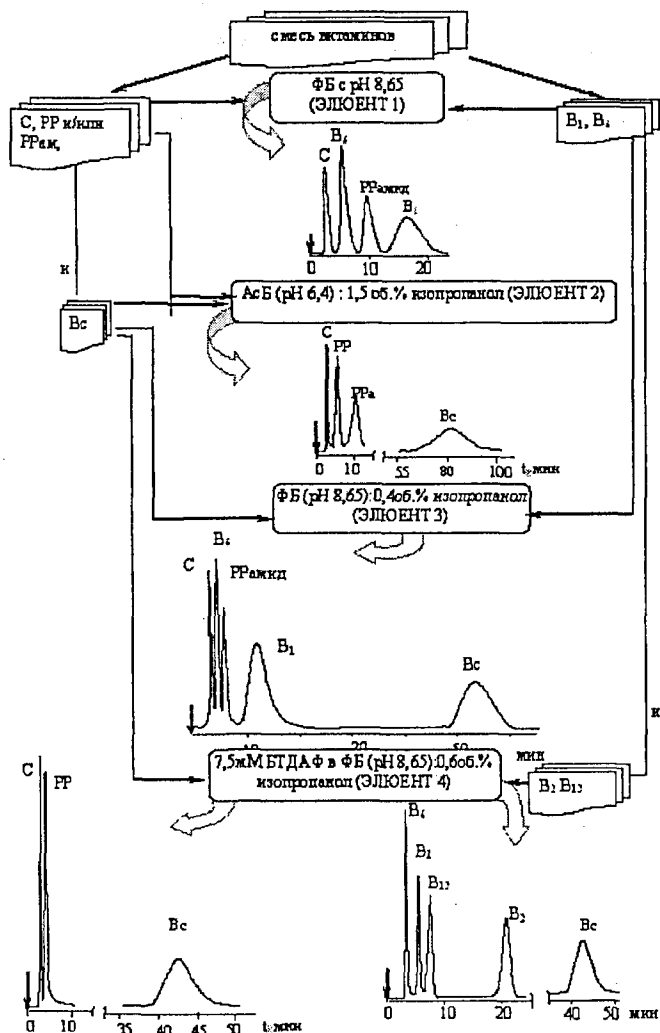


Рис. 6. Схема выбора состава элюента для разделения смеси ВРВ

сорбентом Silasorb C₁₈ по методу сбалансированной плотности. В каждую из колонок отдельным насосом 1' и 2' постоянно подается элюент. Насос 1' подает ЭЛЮЭНТ 3 (ФБ с рН 8,65 : 0,6об.% изопропанол), позволяющий разделять на колонке 7' витамины С, В₆, РРам (РР), В₁. Насос 2' подает на колонку 6' ЭЛЮЭНТ 4 (обеспечивающий разделение и витаминов В₁, В₂, В₁₂, В_с ($H > 4$)).

Анализ смеси ВРВ включает двукратный ввод пробы и выполняется в два этапа. На первом этапе краны 3' и 5' находятся в положении А. В данном случае ЭЛЮЭНТ 3 постоянно кондиционирует ячейку детектора 8', а ЭЛЮЭНТ 4 после кондиционирования колонки 6' покидает хроматографическую систему. Введенная проба потоком ЭЛЮЭНТА 3 направляется в колонку 7', в которой происходит разделение слабоудерживаемых компонентов смеси С, В₆, РРам, В₁.

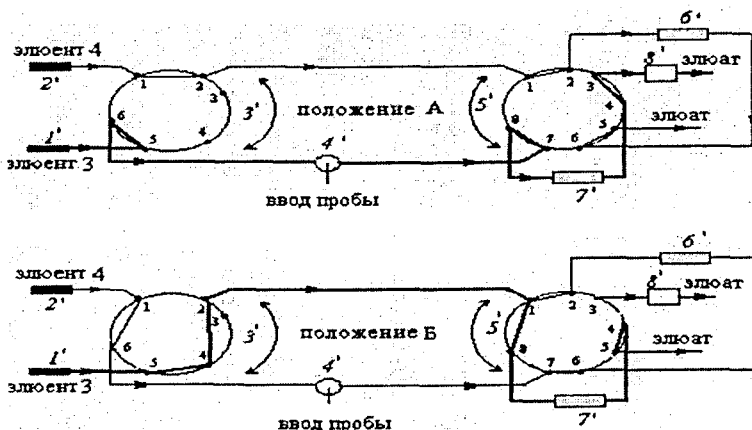


Рис. 7. Схема хроматографической системы. Обозначения: 1', 2' - насосы, 3', 5' - шести- и восьмиходовые краны, 4' - ввод пробы, 6', 7' - аналитические колонки I и II, 8' - детектор.

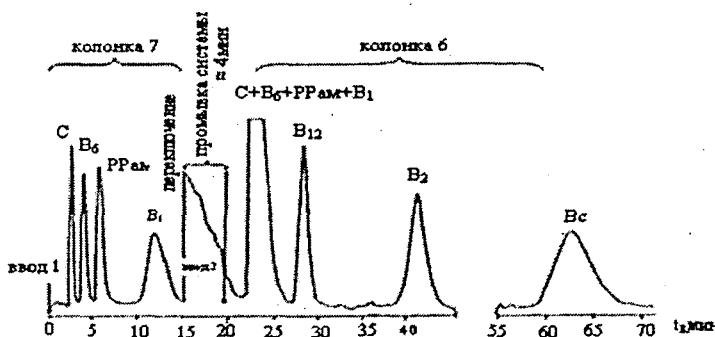


Рис. 8. Хроматограмма модельной смеси ВРВ. Элюирование в режиме переключения колонок. Колонка 7 - ЭЛЮЭНТ 3; Колонка 6 - ЭЛЮЭНТ 4

Сильно удерживаемые витамины V_c , V_2 , V_{12} ($H > 4$) остаются в колонке 7'. После регистрации хроматографического сигнала витамина V_1 ($t_R = 12,49$ мин) через 15 мин после ввода пробы одновременным поворотом кранов 3' и 5' в положение Б поток ЭЛЮЕНТА 4 с колонки 6' направляется в детектор. В течение 3 – 4 минут соединительные узлы хроматографической системы и ячейка детектора промываются ЭЮЕНТОМ 4 (об окончании этой процедуры свидетельствует установление на хроматограмме «нулевой» линии).

На втором этапе производится повторный ввод пробы смеси витаминов, которые потоком ЭЛЮЕНТА 4 направляются в колонку 6'. Витамины С, РР, V_6 , РРам ($H < 4$) в данных условиях имеют низкие K , выходят одним пиком ($R_S < 1$) и не мешают разделению V_c , V_1 , V_2 , V_{12} ($H > 4$). Хроматограмма разделения смеси ВРВ представлена на рис. 8. Затрачиваемое время разделения ВРВ на колонке 6' достаточно для регенерации колонки 7' ЭЛЮЕНТОМ 3. По окончании разделения витаминов с $H > 4$ колонка 7' вновь готова к работе.

Предлагаемая схема не требует дополнительных временных затрат для перевода хроматографической системы в исходный режим. Схема обладает универсальностью, позволяет проводить анализы различных комбинаций витаминов и может быть рекомендована для разработки методик аналитического контроля витаминисодержащей продукции.

Практическое применение разработанной схемы элюирования сорбатов было испытано на фармацевтических препаратах, содержащих ВРВ.

Пределы обнаружения водорастворимых витаминов

Предел обнаружения (ПрО) (табл.3.) рассчитывали по высоте пика, трехкратно превышающей уровень шумов ($3s$ -критерий, средняя высота шумов нулевой линии 2,5 мм).

Таблица 3

Пределы обнаружения водорастворимых витаминов, m_{\min} , мкг в пробе ($n=5$, $P=0,95$)

Состав подвижной фазы	Витамины							
	С	РРам	РР	V_c	V_1	V_2	V_6	V_{12}
ЭЛЮЕНТ 3	9,0	0,3	0,1	-	13	-	5,0	-
ЭЛЮЕНТ 4	2,0	1,0	0,7	2,2	0,7	1,3	0,8	0,06

Контроль содержания витаминов в растворах для инъекций

Анализ индивидуальных витаминов проводили введением в колонку исходного или разбавленного инъекционного раствора. Необходимость в разбавлении определяется исходной концентрацией витамина и его пределом обнаружения.

Согласно разработанной схеме (рис. 6) при хроматографировании инъекционных препаратов «Никотиновая кислота», «Витамин V_1 », «Витамин V_6 » возможно применение обоих элюентов: ЭЛЮЕНТ 3 и ЭЛЮЕНТ 4. При анализе растворов для инъекций «Цианкобаламин» и «Мильгам-

ма» препараты непосредственно вводили в хроматограф; в качестве ПФ может быть только ЭЛЮЭНТ 4 (рис. 6).

Правильность методик определения витаминов оценивали сравнением с заявленным изготовителем. Относительное стандартное отклонение S_r определения не превышает 5 % (табл.4).

Таблица 4

Метрологические характеристики методик определения ВРВ в инъекционных препаратах (n=5, P=0,95)

Препарат	Регламентированное содержание витамина		ЭЛЮЭНТ 4			ЭЛЮЭНТ 3		
			\bar{x} , мг	$\pm\delta$	S_r	\bar{x} , мг	$\pm\delta$	S_r
Никотиновая кислота	PP	1 %масс	9,84	$\pm 0,12$	0,01	9,82	$\pm 0,16$	0,01
Витамин В ₁	В ₁	5 %масс	49,12	$\pm 0,79$	0,01	48,58	$\pm 0,90$	0,02
Витамин В ₆	В ₆	5 %масс	48,98	$\pm 0,84$	0,01	48,92	$\pm 0,89$	0,02
Цианкобаламин	В ₁₂	0,2, мг	0,196	$\pm 0,005$	0,02	—	—	—
	В ₆	100,0 мг	989,8	$\pm 13,54$	0,01	—	—	—
	В ₁	100,0 мг	988,9	$\pm 17,12$	0,01	—	—	—
Мильгамма	В ₁₂	1,0 мг	0,989	$\pm 0,017$	0,01	—	—	—

Контроль содержания витаминов в таблетированных фармацевтических препаратах

Для анализа разработан общий алгоритм пробоподготовки таблетированных препаратов (рис. 9). С целью облегчения читаемости приведенной схемы витамины объединены в группы: I - С, В₁, РРамид, РР, В₁₂; II - В₂, В_с.

Разработка методики определения смеси ВРВ осуществлялась на поливитаминных таблетированных препаратах «Нейромультивит», «Пентовит» и «Декамевит». Проверку правильности методики осуществляли введением стандартных добавок ВРВ, с нахождением содержания стандарта и исходного содержания ВРВ по градуировочным зависимостям (табл. 5).

Таблица 5

Оценка правильности методики определения ВРВ в витаминных препаратах (n=5, P=0,95)

Витамин	Введено стандарта, мг/мл	S_r , мм ²		Найдено стандарта, $\bar{C} \pm \delta$, мг/мл	S_r
		исходной пробы	с добавкой		
Пентовит					
В ₆	0,5	134,0	175,4	0,49 \pm 0,02	0,04
РР _{авид}	0,4	664,1	735,1	0,38 \pm 0,038	0,08
В ₁	1,0	230,4	345,6	1,01 \pm 0,04	0,04
В ₁₂	0,006	411,7	495,8	0,006 \pm 0,0006	0,09
В _с	0,45	57,9	133,5	0,44 \pm 0,039	0,07
Декамевит					
С	2,62	214,8	234,2	2,61 \pm 0,03	0,01
РР _{авид}	0,85	659,1	729,0	0,85 \pm 0,02	0,02
В ₁	2,0	181,1	293,5	2,01 \pm 0,08	0,03
В ₁₂	0,006	239,2	323,0	0,006 \pm 0,0007	0,09
В ₂	0,50	381,4	501,0	0,49 \pm 0,02	0,03
В _с	0,45	76,5	196,5	0,44 \pm 0,01	0,03

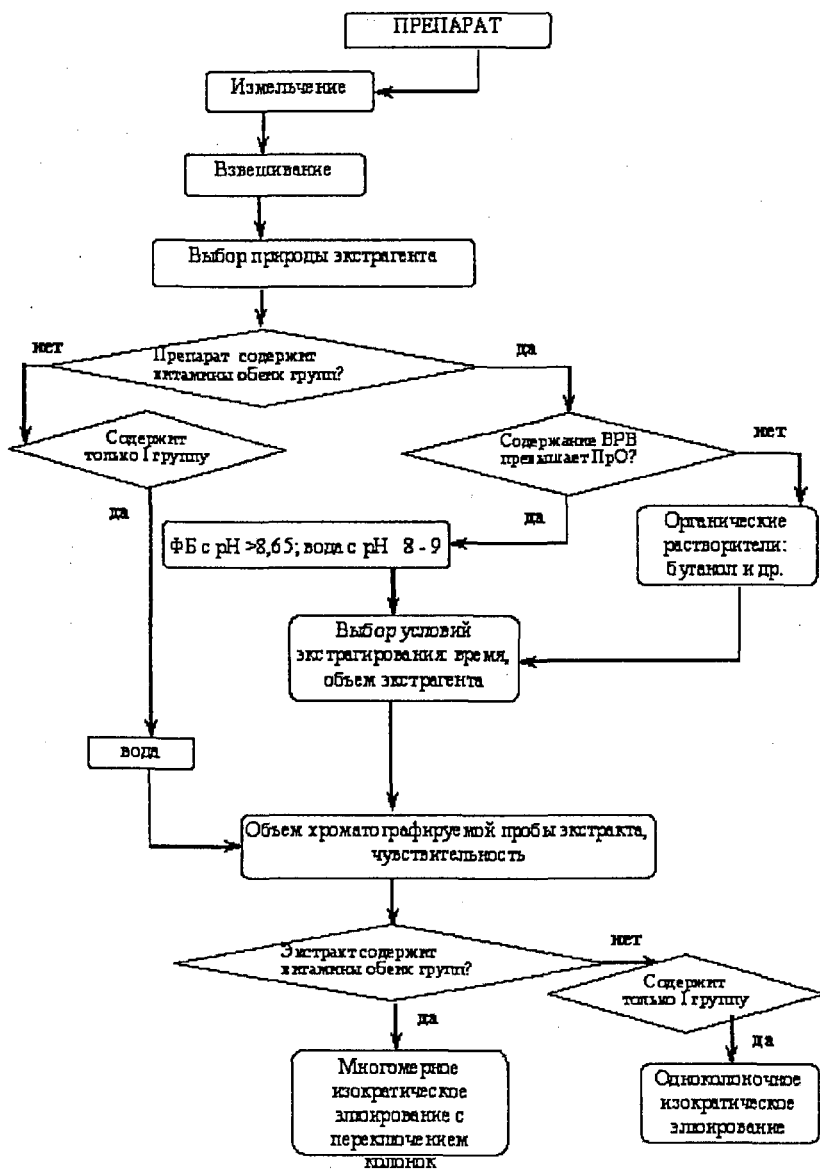


Рис. 9. Схема выбора процедуры подготовки пробы и техники хроматографирования на базе предварительной информации о составе препарата.

Метрологические характеристики методик анализа представлены в табл. 6.

Таблица 6
Метрологические характеристики методик определения ВРВ в препаратах (n=5, P=0,95)

Препарат	Регламентированное содержание витамина, мг		Найдено \bar{x} , мг	$\pm\delta$, мг	S_r
	В ₆	5,0			
Пентовит	PP _{амид}	20,0	19,39	$\pm 0,80$	0,03
	В ₁	10,0	9,39	$\pm 1,21$	0,10
	В ₁₂	0,05	0,049	$\pm 0,008$	0,07
	Вс	0,4	0,038	$\pm 0,035$	0,07
	С	200,0	198,4	$\pm 2,30$	0,01
Декамевит	PP _{амид}	50,0	49,05	$\pm 0,69$	0,01
	В ₁	20,0	19,25	$\pm 0,78$	0,04
	В ₂	10,0	9,93	$\pm 0,21$	0,02
	В ₁₂	0,10	0,095	$\pm 0,011$	0,12
	Вс	2,0	1,98	$\pm 0,13$	0,06
Нейромультивит	В ₆	200,0	198,62	$\pm 7,13$	0,03
	В ₁	100,0	99,22	$\pm 2,65$	0,02
	В ₁₂	0,20	0,19	$\pm 0,009$	0,04

Описание всех разработанных методик с подробным регламентом выполнения измерений приведены в тексте диссертации.

Представленные методики характеризуются универсальностью, простотой в выполнении, не требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, характеризуются минимальной пробоподготовкой. Разработанная схема двойного хроматографирования с переключением колонок расширяет возможности методик и прибора. Это позволяет рекомендовать методики для количественного контроля ВРВ в фармацевтических препаратах в аналитических службах предприятий. Проведенные исследования могут быть положены в основу базовых методик определения витаминов в косметических товарах и пищевых продуктах.

Выводы

В целях разработки экспрессных методик количественного контроля содержания водорастворимых витаминов в многокомпонентных фармацевтических рецептурах на основе изократической обращено-фазовой ВЭЖХ:

1. Проведено систематическое исследование и обобщение результатов хроматографического поведения водорастворимых витаминов: хлорида тиамин (витамин В₁), рибофлавина (В₂), гидрохлорида пиридоксина (В₆), цианкобаламина (В₁₂), аскорбиновой кислоты (С) никотиновой кислоты (РР), амида никотиновой кислоты (РРамид), фолиевой кислоты (Вс) на сорбенте нерегулированной формы Silasorb C₁₈ при элюировании водосодержащими бинарными подвижными фазами.
2. Изучено влияние на хроматографическое разделение витаминов в ОФ ВЭЖХ состава подвижной фазы: природы и концентрации модификатора, рН и ионной силы элюента. Установлен оптимальный состав ПФ (ФБ с рН 8,65 : 0,4об.% изопропанол), обеспечивающий эффективное разделение пятикомпонентной смеси витаминов - С, РРамид, В₆, В₁, Вс. Показана возможность интер-

претации результатов хроматографического поведения ВРВ с помощью универсального квази-химического уравнения.

3. Проведены квантово-химические расчеты: электронного строения и энергии взаимодействия водорастворимых витаминов в хроматографической системе «Silasorb C₁₈ - вода»; характеристик гидрофобности Шапца (*H*) и Ганча-Лео (*log P*). Установлена взаимосвязь параметров удерживания исследованных соединений и критерия Шапца.
4. Проведено комплексное исследование влияния состава подвижной фазы (природы и концентрации ИПР, рН элюента, количества органического модификатора) на хроматографическое разделение ВРВ в условиях ион-парной обращено-фазовой ВЭЖХ при изократическом элюировании. Показана перспективность применения в качестве ион-парного реагента фосфониевых солей. Достигнуто разделение с $Rs > 1$ витаминов кислотного характера – С, РР, В_с, либо – В₁, В₂, В₆, В₁₂, В_с при элюировании ПФ состава: 7,5 мМ БТДАФ в ФБ с рН 8,65 : 0,606.% изопропанол.
5. Составлена рациональная схема выбора хроматографической системы для анализа различных сочетаний смесей витаминов. Охарактеризованы эффективность, селективность и время анализа смесей.
6. Предложена схема многомерного хроматографирования, сочетающая ОФ и ион-парную ОФ ВЭЖХ в режиме изократического элюирования, которая обеспечивает эффективное разделение всего спектра исследованных витаминов, одновременно присутствующих в анализе. Оптимизирован режим ее работы.
7. Разработаны методики определения ВРВ в сложных многокомпонентных фармацевтических рецептурах (инъекционные препараты и таблетированные формы). Достоинством предлагаемых методик являются возможность одновременного качественного и количественного контроля водорастворимых витаминов, отсутствие сложного алгоритма пробоподготовки, высокая точность и экспрессность, низкая стоимость серийных анализов. Методики прошли испытания на предприятиях г. Белгорода (технические акты внедрения включены в приложение диссертации).

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Хроматографическое разделение при аналитическом контроле водорастворимых витаминов и физиологически активных кислот в многокомпонентных рецептурах. // Журн. «Сорбционные и хроматографические процессы». – 2005. – Т. 5, № 2. – С. 180 – 201.
2. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Экологический контроль физиологически активных веществ методом ВЭЖХ. // Журн. «Вестник БГТУ им В.Г.Шухова». – 2005. – № 12. – С. 77- 79.
3. Филимонов В.Н., Сирицо С.И., Дмитриева Р.П. Математическое планирование эксперимента при выборе хроматографической системы для ион-парной ВЭЖХ физиологически активных веществ. // Журн. «Вестник БГТУ им В.Г.Шухова». – 2005. – № 12. – С. 74 – 77.
4. Филимонов В.Н., Сирицо С.И., Макрушин. Н.А. Особенности хроматографического разделения водорастворимых витаминов изократической ОФ ВЭЖХ. // Журн. «Сорбционные и хроматографические процессы». – 2006. – Т 6., № 2. – С. 191-197.

5. Филимонов В.Н., Сирицо С.И., Баятинская Л.Н. Регулирование сорбционных процессов в системе «Сорбент – элюент - сорбат» при хроматографировании водорастворимых витаминов ОФ ВЭЖХ. //Изв. Тульского Государственного университета. Сер. «Химия». 2006, Вып.6. – С. 78 – 84.
6. Филимонов В.Н., Сирицо С.И., Баятинская Л.Н. Ионная и ион-парная ВЭЖХ для разделения физиологически активных кислот и водорастворимых в многокомпонентных препаратах. //Материалы XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Казань, 2003. – С. 555.
7. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Катионно-активные ПАВ как ион-парные реагенты при разделении физиологически активных веществ в ВЭЖХ. //Материалы XI конф. «Поверхностно-активные вещества – наука и производство». Шебекино, 2003. – С.19 – 20.
8. Филимонов В.Н., Сирицо С.И., Замуруев О.В., Баятинская Л.Н. Экохимический мониторинг витаминсодержащих лекарственных препаратов методом ВЭЖХ. //Материалы V Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика - 2003». Санкт-Петербург, 2003. – С. 133
9. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Самоорганизация хроматографической системы при разделении водорастворимых витаминов методом ион-парной ВЭЖХ. //Материалы II Всероссийской конференции «Физико-химические процессы в конденсированном состоянии и на межфазных границах» («Фагран - 2004»), Воронеж, 11 – 15 октября 2004. – С. 345.
10. Филимонов В.Н., Сирицо С.И., Баятинская Л.Н. Внеколоночное образование ионной пары для разделения смеси карбоновых и оксикислот методом ион-парной ВЭЖХ. //Тезисы VII конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», Новосибирск, 11 – 16 октября 2004. – С. 274.
11. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Возможности изократического элюирования для разделения смеси водорастворимых витаминов методом ОФ ВЭЖХ. // Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии: матер II Междунар. симпоз.- Краснодар, 2005. – С. 91.
12. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Алкиламнинофосфониевые соединения как ион-парные реагенты для разделения водорастворимых витаминов методом ион-парной ОФ ВЭЖХ. // Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии: матер II Междунар. симпоз.- Краснодар, 2005. – С. 279.
13. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Экстракционное выделение и концентрирование витамина В12 при хроматографическом контроле поливитаминных препаратов. //III Международная конференция «Экстракция органических соединений»; каталог докл., - Воронеж, 17 – 21 октября 2005. – С. 321.
14. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Оценка распределения межмолекулярных взаимодействий в системе: «Силасорб С18 – водорастворимый витамин - элюент» по данным ОФ ВЭЖХ. // III международный симпозиум «Физико-химические процессы в конденсированном состоянии и на межфазовых границах. «Фагран - 2006» Воронеж. 2006. Т.2 – С. 255 – 258.

15. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Экологический мониторинг фармацевтических препаратов методом обращено-фазовой ВЭЖХ [Электронный ресурс]//Матер.III Международная научно-практическая конференция Проблемы экологии: промышленность, образование. 25-27 октября 2006. Белгород.
16. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Применение вариантов ВЭЖХ на неполярной фазе при контроле содержания водорастворимых витаминов фармацевтических препаратах// II Всероссийская конференция «Аналитика России»: тез.докл., Краснодар. -2007, -С.468.
17. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Разделение смеси водорастворимых витаминов методами обращенно-фазовой и ион-парной ВЭЖХ//II Междунар. форум «Аналитика и аналитики». Рефераты докладов. Воронеж, 2008. – С. 524.

Заказ № 674/558. Объем 1,4 п.л. Тираж 100 экз.
Редакционно-издательский центр НИ (филиал) ГОУ ВПО РХТУ им. Д.И. Менделеева