



Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента

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

Воронежский государственный университет, Воронеж

Аннотация

В результате данной работы предложена методика определения β -каротина методом тонкослойной хроматографии, которая может быть использована в фармацевтической, косметологической и пищевой промышленности. Разработанная методика была апробирована на маслах облепихи и шиповника. Методика может найти применение для рутинного анализа растительных масел на предмет фальсификации и каротиноидного состава

Введение

Каротиноиды, витамины группы А, липофильны, имеют значительное количество двойных связей и являются вследствие этого нестойкими [1].

Анализ каротиноидов, согласно данным литературных источников [1-6], осуществляют, в основном, хроматографическими методами. Метод ВЭЖХ в настоящее время занимает лидирующие позиции в современных научных исследованиях в виду возможности одновременного разделения суммы веществ, присутствующих во всех биологических объектах, а также качественного и количественного определения индивидуальных компонентов. Спектрофотометрия в видимой и УФ-области может быть использована лишь для определения подлинности, степени чистоты и количественной интерпретации индивидуальных веществ группы каротиноидов [7,8] или позволяет установить только их суммарное содержание без достоверной информации о присутствии отдельных соединений [9-11]. Однако, анализ иностранных литературных источников [12-14] показывает, что применение метода производной спектрофотометрии является весьма перспективным, так как позволяет проводить определение каждого индивидуального вещества при их совместном присутствии, исключая сложные процедуры предварительного разделения компонентов.

Значительное внимание уделяется методу ТСХ для разделения и идентификации сложных соединений, таких как каротиноиды. Преимущества этого метода (экспрессность, простота, доступность, возможность препаративного разделения и малое количество анализируемого вещества) делают его незаменимым при исследовании этого сложного класса веществ [1,3]. В ТСХ на процесс хроматографирования влияют существенным образом растворитель [15], сорбент и условия анализа, причем наиболее сильным может оказаться влияние растворителя [6]. Развитие возможности количественной интерпретации данных ТСХ [16] может способствовать дальнейшему распространению этого метода, как альтернативного ВЭЖХ, обладающего всеми преимуществами хроматографического анализа.

В связи с вышесказанным, целью исследования являлась разработка методики идентификации β -каротина методом ТСХ, как одного из наиболее фармакологически активных веществ группы каротиноидов.

На первом этапе работы был выбран детектирующий реагент – вещество, взаимодействующее с определяемым компонентом с образованием окрашенных продуктов, которые можно визуально или инструментально идентифицировать. Для этой цели были исследованы различные проявители, рекомендуемые в литературе [1,3,7,17], а также подобранные нами самостоятельно. Критерием отбора проявителей являлась высокая чувствительность реакции и образование устойчивого интенсивного окрашивания продуктов взаимодействия каротиноидов с детектирующим реагентом, а также контрастностью хроматографических зон и фона, что может позволить проводить дальнейший количественный анализ с применением сканирующих устройств. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика детектирующих реагентов для определения β -каротина в тонком слое сорбента

№ п/п	Детектирующий реагент	Эффект
1	5 % спиртовый раствор фосфорномолибденовой кислоты (ФМК)	Не обладает достаточной чувствительностью
2	10 % спиртовый раствор ФМК с добавлением конц. хлороводородной кислоты (25 : 1) [1,17]	
3	Конц. хлороводородная кислота	Появляется быстроисчезающее темно-синее окрашивание на белом фоне
4	Конц. азотная кислота	
5	Конц. хлорная кислота [1]	
6	Конц. серная кислота [1]	Обугливание пластинки
7	Без проявителя [7]	Обнаруживаются желто-оранжевые четкие зоны на белом фоне

В виду того, что β -каротин имеет яркий желто-оранжевый цвет, обусловленный наличием в структуре его молекулы системы сопряженных двойных связей, идентификацию на хроматограмме возможно проводить визуально, без применения каких-либо детектирующих реагентов.

Наибольшее влияние на поведение веществ в тонком слое сорбента оказывает растворитель, поэтому на следующем этапе проведена работа по подбору элюентов для определения β -каротина в тонком слое сорбента. Были исследованы системы, предложенные в литературе [1,3,7], а также изучены новые хроматографические системы. Новые хроматографические системы подбирались таким образом, чтобы суммарная полярность подвижной фазы (P') примерно соответствовала рекомендуемой в литературе [1,3,7]. Элюенты готовили смешением компонентов в указанных соотношениях (табл. 2) непосредственно перед использованием. В процессе приготовления смешанных элюентов необходимо учитывать точную дозировку веществ, поскольку даже небольшие изменения состава смеси могут привести к изменению величины R_f [15]. Для каждой элюирующей системы были рассчитаны полярность (P') [18]; относительная скорость перемещения β -каротина (величина R_f); высота, эквивалентная теоретической тарелке (H); число теоретических тарелок (N). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Хроматографические параметры β -каротина в различных элюирующих системах

№ п/п	Элюент	R_f	H , мм	N	K	P'
1	Хлороформ [1,3]	0,98±0,01	0,95	103,2	0,01	4,40
2	Бензол [1,3]	0,97±0,01	0,347	221,76	0,01	3,00
3	Гексан	0,193±0,01	0,94	93,62	4,58	0
4	Гексан – бензол (1 : 1)	0,95±0,01	1,513	55,54	0,05	1,50

5	Бензол – ацетон (25 : 1) [7]	0,98±0,01	0,76	115,5	0,01	3,09
6	Гексан – бензол (14 : 1)	0,69±0,02	0,43	193,02	0,45	0,20
7	Гексан – бензол (5 : 1)	0,98±0,01	0,41	214,6	0,01	0,5
8	Гексан – бензол (9 : 1)	0,74±0,02	0,28	275	0,35	0,3
9	Гексан – хлороформ (2 : 1) [17]	0,98±0,01	1,15	76,5	0,01	1,47
10	Гексан – хлороформ (3 : 1)	0,98±0,01	0,74	118,92	0,01	1,10
11	Гексан – бензол (19 : 1)	0,575±0,01	0,783	102,17	0,754	0,15
12	Гексан – бензол (29 : 1)	0,376±0,01	0,78	108,97	1,703	0,10

Хроматограммы, полученные в описанных выше системах, представлены на рис. 1.

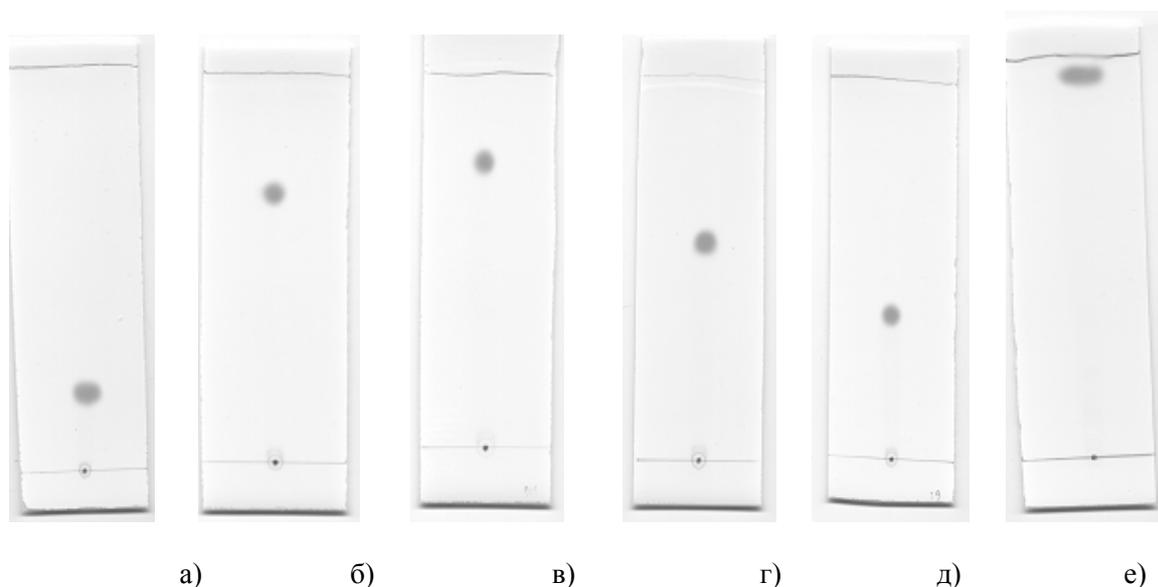


Рис. 1. Хроматограммы, полученные в элюирующих системах: а) гексан; б) гексан – бензол (14 : 1); в) гексан – бензол (9 : 1); г) гексан – бензол (19 : 1); д) гексан – бензол (29 : 1); е) хлороформ

Оптимальным для практической ТСХ является интервал значений R_f от 0,3 до 0,5. Определив величину R_f , можно рассчитать другой важный хроматографический параметр, характеризующий селективность сорбента и исследуемого вещества - фактор удерживания (К). Эффективность процесса хроматографирования характеризует высота, эквивалентная теоретической тарелке (Н) и число теоретических тарелок (N) [15].

Как видно из табл. 2, оптимальная величина R_f получена в системах № 6,8,11 и12; N – в системах № 2, 6 – 8; Н – в системах № 2, 6 - 8. Следовательно, эффективность хроматографического процесса достигается в данных элюентах. Важной характеристикой любого хроматографического процесса является изотерма сорбции. В адсорбционной хроматографии она носит название изотермы адсорбции. Вид изотермы сорбции влияет на форму хроматографической зоны [15]. Различают три основных формы изотермы: линейную, выпуклую и вогнутую. Связь между изотермой сорбции и формой пятна в ТСХ представлена на рис. 2.

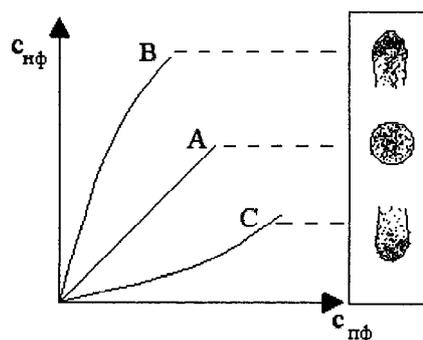


Рис. 2. Связь между изотермой сорбции и формой пятна в ТСХ [15]

В практической работе нелинейность изотерм является нежелательным фактором, поскольку приводит к изменению формы зон и влияет на эффективность хроматографического процесса и возможность дальнейшей интерпретации данных. Однако, только в системах № 6, 8, 11 и 12 зоны имели округлую форму, что свидетельствует о линейной изотерме сорбции β -каротина в данных условиях. В результате, по совокупности представленных параметров (R_f , линейность изотермы сорбции, H , N) и качеству хроматографических зон для определения β -каротина в тонком слое сорбента была выбрана элюирующая система № 12.

На основе данных таблицы 2 была построена зависимость величины относительной подвижности компонента (R_f) (рис. 3) от полярности системы (P').

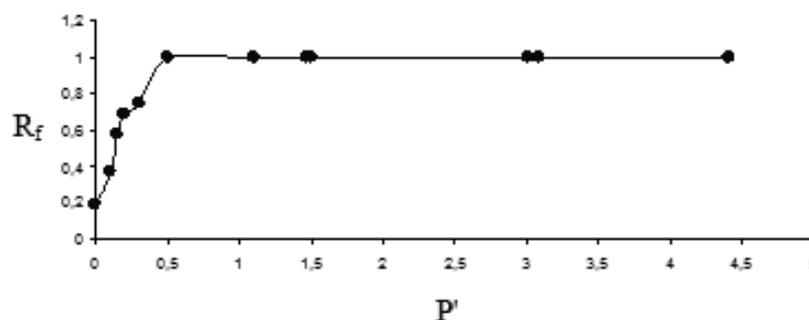


Рис. 3. Зависимость величины R_f от значения полярности элюента

Установлено, что в интервале от 0 до 0,2 ед. полярности зависимость носит линейный характер (рис. 4). Проведена статистическая оценка параметров линейной зависимости путем расчета величины коэффициента корреляции (r) [19]. Для полученной зависимости $|r| = 0,9864$ (рис. 4).

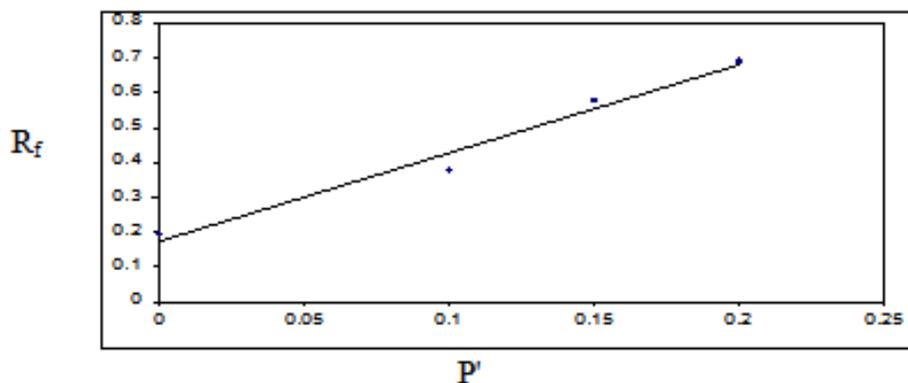


Рис. 4. Линейная зависимость величины R_f от значения полярности элюента

Уравнение линейной зависимости имеет вид: $R_f = 2,54P' + 0,17$. С помощью установленной зависимости можно подбирать различные системы для определения β -каротина в тонком слое сорбента, таким образом, чтобы величина R_f укладывалась в оптимальные значения. Следовательно, интервал полярностей элюента может варьировать от 0,05 до 0,168.

По совокупности полученных нами результатов были выбраны оптимальные условия определения β -каротина методом хроматографии в тонком слое сорбента:

- Хроматографические пластинки марки «Sorbfil» размером 5×10 см с алюминиевой или полимерной подложкой;
- Элюент : гексан – бензол (29 : 1);
- Проявитель – не требуется;
- Время насыщения камеры парами элюента: 15 – 20 мин;
- Время экспонирования: 30 мин;
- Объем наносимой пробы : 10 мкл раствора с содержанием β -каротина 1 мг/мл.

Кроме этого, следует отметить, что развитие хроматограмм предпочтительно проводить в затемненном помещении или защищая хроматографическую камеру от действия прямого яркого света во избежание обесцвечивания хроматографических зон, что обусловлено высокой фотоллабильностью β -каротина. Пластинку необходимо помещать в хроматографическую камеру, не дожидаясь полного высыхания пробы. Просмотр и обработка хроматограмм проводится сразу после испарения элюента при комнатной температуре.

В целом, метод ТСХ достаточно чувствителен, экономичен и не требует сложного оборудования. Время анализа с его использованием сокращается в несколько раз по сравнению с хроматографией на бумаге и колоночной хроматографией. В связи с этим, метод ТСХ, как нам представляется, наиболее приемлем для серийных анализов многокомпонентных биологических объектов, в том числе и растительных масел (РМ).

На завершающем этапе работы, разработанная методика идентификации β -каротина была апробирована на натуральных РМ, богатых каротиноидами [20-22], таких как масло шиповника и масло плодов облепихи.

Для проведения ТСХ анализа, готовили растворы изучаемых объектов в хлороформе марки х.ч. в соотношении масло – растворитель (1:2). В описанных выше условиях осуществляли хроматографирование проб объемом 5 мкл. Полученная хроматограмма представлена на рис. 5.



Рис. 5. Вид хроматограммы растворов РМ: точка 1 – масло плодов облепихи; точка 2 – масло шиповника.

Рис. 5 показывает, что кроме зоны β -каротина, идентифицированной по величине R_f (табл. 3), обнаружены и другие хроматографические зоны каротиноидов (имели желто-оранжевое окрашивание, постепенно исчезающее под действием света). На хроматограмме допускается пятно на линии старта в месте нанесения пробы. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Идентификация β -каротина и параметры хроматографического разделения каротиноидов в растительных маслах.

№ пятна	Величина R_f	K	$L = K_1/K_2$
Облепиховое масло (точка 1)			
1 - β -каротин	0,37±0,01	1,703	2,35
2	0,58±0,01	0,724	
3	0,72±0,01	0,39	1,86
4	0,87±0,001	0,15	2,6
Масло шиповника			
1 - β -каротин	0,36±0,005	1,78	1,78
2	0,5±0,02	1,00	
3	0,8±0,02	0,25	4,00

Из данных табл. 3 следует, что изучаемые РМ имеют различный каротиноидный состав, что согласуется с литературными данными [20-22]. В использованной элюирующей системе наблюдается удовлетворительное разделение хроматографических зон каротиноидов, так как значение селективности сорбции ($L = K_n/K_{n+1}$), т.е. отношение коэффициентов распределения (K) двух веществ больше единицы (табл. 3). Чем больше величина L, тем лучше будет разделение, так как зоны компонентов располагаются друг от друга на большом расстоянии [15]. Разработанная методика может быть включена в НД в качестве способа экспресс-анализа β -каротина в РМ.

Таким образом, в результате данной работы предложена методика определения β -каротина методом ТСХ, которая может быть использована в фармацевтической, косметологической и пищевой промышленности. Разработанная методика может найти применение для серийных анализов растительных масел на предмет фальсификации и каротиноидного состава.

Список литературы

1. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Том 2. М., Мир, 1980г. 610 С.
2. Лутцева А. И., Маслов Л. Г., Середенко В. И. Методы контроля и стандартизации лекарственных препаратов, содержащих жирорастворимые витамины. // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35. № 10. С. 41 – 45.
3. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М., Мир, 1981г. С. 402 – 407.
4. Дейнека В.И., Дейнека Л.А. Инкрементный подход в анализе каротиноидов методом ОФ ВЭЖХ. Разделение диэфиров ксантофиллов. // Журн. Сорбционные и хроматографические процессы. 2006. Т. 6. Вып. 3. С. 366-375.
5. Беляев Д.С., Фан Винь Тхинь, Хорохордина Е.А., Подолина Е.А., Рудаков О.Б. Экспресс-анализ триглицеридов и биологически активных компонентов растительных масел

методом микроколоночной ВЭЖХ с УФ-детектором. // Тез.докл. 3-ей Всеросс. Научно-методической конф. «Фармообразование – 2007». Воронеж. 2007. С. 66 – 68.

6. Ключев С. А. Определение витаминов А и Е методом ВЭЖХ с предварительным равновесным распределением в двух несмешивающихся жидких фаза. // Журн. Аналитической химии. М., Наука. 1996. Т. 51, № 9, С. 961 – 963.

7. ВФС 42-3128-98, «Драже бета-каротина 0,0025».

8. ФС 42-3182-95, «Аекол».

9. НД 42-42-10179-99, «Масло шиповника».

10. ФС 42-3873-99. Масло облепиховое в ректокапсулах по 0,55 для детей.

11. Беликов В.Г. Анализ лекарственных веществ фотометрическими методами. // Рос. хим. журн., 2002, Т. XLVI, № 4, С. 52 – 56.

12. Hui Ni, Guo-qing, Hui Ruan, Qi-he Chen, Feng Chen. Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract. // J Zhejiang Univ Sci B. 2005 June, 6(6), pp. 514-522.

13. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. // FASEB J. 1995, 9, pp. 1551-1558.

14. Ong ASH, Tee ES. Natural sources of carotenoids from plants and oils. // Meth Enzymol. 1992, 213, pp. 142-167.

15. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. Т. 1, М., Мир, 1999г., 405 С.

16. Герасимов А.В. Применение программной обработки сканированных изображений хроматограмм в количественной планарной хроматографии. // Журн. Аналитической химии. М., Наука. 2004. Т. 59, № 4, С. 392 – 397.

17. Рыбакова О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. Выбор оптимальных условий для определения витамина А методом хроматографии в тонком слое сорбента. // Тез. докл. III Всеросс. конф. «Фармообразование – 2007г». Воронеж. 2007. С. 301-303.

18. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В., Филиппов А.А., Селеменев В.Ф., Приданцев А.А. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. // Воронеж., Изд-во «Водолей». 2004 г., 528 С.

19. ГФ XI изд. Вып. 1, М., Медицина, 1987 г., С. 217-220.

20. Кислухина О.В., Румянцев В.Ю., Малахов А.Е., Соболева К.Е. Витаминизированные масла из плодов кустарниковых пород. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2003. №5, С. 60 – 62.

21. Гнусарева Р.В., Шленская Т.В., Грузинов Е.В. Пигментный комплекс плодов облепихи, районированной в Приморском крае. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2005. № 5, С. 52-53.

22. Тимофеева В.Н., Черепанова А.В., Полякова Т.А., Лачева Н.В. Зависимость химического состава плодов шиповника от степени их зрелости и сортовых особенностей. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2004. № 12, С. 49-50.