



УДК 543.867:543.544

Оптимизация условий определения витамина D₂ методом хроматографии в тонком слое

Китаева Т.А., Бородина Е.В., Сафонова Е.Ф., Селеменев В.Ф.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Аннотация

Произведен выбор оптимальных условий для идентификации и количественного определения витамина D₂ методом хроматографии в тонком слое сорбента. Показана возможность использования компьютерной программы "Sorbfll Videodencitometer" для обработки полученных хроматограмм. Установлена градуировочная зависимость площади хроматографической зоны от концентрации эргокальциферола. Разработанная методика может быть применена для определения витамина D₂ в растительных объектах различной природы

Введение

Важными биологически активным веществом в жизнедеятельности организма является эргокальцеферол (рис.1). Эргокальцеферол регулирует обмен фосфора и кальция в организме, стимулирует кальцинацию костей. Эргокальциферол - эффективное средство для профилактики и лечения заболеваний кожи и слизистых оболочек. Витамины группы D применяют при рахите, некоторых формах туберкулеза и др.[1]

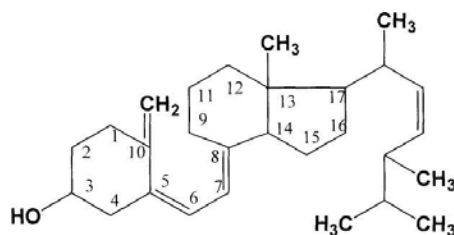


Рис. 1. Химическое строение молекулы эргокальциферола (6-(3а-окси-10-метиленициклогексан-5-илен)-7-(13-3-метилгидриндан-8-илен)-этана)

В последнее время наблюдается расширение сырьевой базы для получения витаминных препаратов из нетрадиционных источников - масел. В связи с этим возникает необходимость разработки методики выделения и анализа витаминов, которые содержатся в природных объектах в микроколичествах.

На сегодняшний день существует достаточно большое количество методик, позволяющих проводить определение эргокальциферола в различных образцах: УФ -

спектрофотометрия, колориметрические методы, газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография и др.[2,3,4]

Целью настоящего исследования является подбор оптимальных условий анализа витамина D₂ в растительных маслах методом тонкослойной хроматографии.

Данный вид хроматографии позволяет наряду с отделением эргокальцеферола от других сопутствующих веществ, содержащихся в растительных объектах, проводить идентификацию витамина в образце. Кроме того, анализ исследуемого соединения методом ТСХ является экономически целесообразным, доступным и экспрессным, представляет определенный интерес и может использоваться для определения эргокальцеферола в пищевой и фармацевтической промышленности.

Эксперимент

При разделении сложных биохимических объектов методом хроматографии в тонком слое сорбента, к которым относится эргокальцеферол, оптимальные условия разделения выбираются экспериментально с учетом влияния различных факторов: концентрации раствора, соотношения растворителей в элюенте, типа проявителя и т.д. При правильно подобранных условиях анализа получают результаты, хорошо согласующиеся друг с другом.

Для определения эргокальцеферола было исследовано пять элюирующих систем для каждого соединения (табл.1). Определение проводили на пластине марки Sorbfil (Краснодар), размером 10×10 см, сорбент - силикагель с зернением 5-12 мкм. Расстояние, пройденное элюентом от линии старта до линии фронта (Z_f) составляет 8см. В качестве проявителя для определения витамина D₂ применяли кислоту серную концентрированную. При взаимодействии с ней витамин D₂ образует комплексное соединение фиолетового цвета. Идентификацию хроматографических зон осуществляли по относительной скорости перемещения вещества на пластине (R_f). На основании экспериментальных данных, представленных в таблице 1, наиболее оптимальным элюентом для определения витамина D₂ выбран тетрахлорметан – эфир диэтиловый (4 : 1).

Таблица 1. Хроматографические характеристики эргокальцеферола в различных элюирующих системах

№	Элюент	R_f	$H, \text{мкм}$	N
1	Тетрахлорметан – эфир диэтиловый (4:1)	0,23	71000	101,4
2	Гексан – эфир диэтиловый (4:1)	0,11	100000	76,0
3	Октан – эфир диэтиловый (4:1)	0,09	229000	33,2
4	Гексан – этилацетат (9:1)	-	-	-
5	Бензол – петролейный эфир (4:1)	-	-	-

Термодинамические параметры рассчитывали по формулам [5]:

$$R_f = \frac{Z_x}{Z_f}; H = \frac{\sigma_x^2}{Z_x}; N = \frac{Z_f}{H}$$

где Z_x - расстояние, пройденное веществом от точки нанесения пробы до центра зоны, см; H - высота, эквивалентная теоретической тарелке, мкм; σ_x – стандартное отклонение дисперсии пятна по оси X, см; N - число теоретических тарелок.

Количественное определение проводили методом абсолютной градуировки. Сразу же после проявления хроматографических зон, пластины сканировали, а полученные изображения обрабатывали компьютерной программой Sorbfil

Videodensitometer. Принцип работы программы состоит в построении аналоговой кривой хроматограммы по отклонению яркости пятен от яркости фона с последующим нахождением пиков на этой кривой и расчетом их площади. В результате были получены треки в координатах R_f – интенсивность (рис.2). Максимум на кривой соответствует центру зоны, площадь под кривой – площади пятна, а высота пика – интенсивности хроматографической зоны.

Обсуждение результатов.

Наибольшее влияние на разделения веществ в тонком слое сорбента оказывает растворитель, поэтому нами была проведена работа по подбору элюентов для определения витамина D_2 .

Известно несколько элюирующих систем для определения эргокальцеферола. Нами исследованы предложенные авторами [2,3] и новые (№1 и №2 табл.2) элюирующие системы: 1) тетрахлорметан – диэтиловый эфир (4:1); 2) гексан – диэтиловый эфир (4:1); 3) октан – диэтиловый эфир (4:1); 4) гексан – этилацетат (9:1) 5) бензол – петролейный эфир (4:1).

Для каждой системы растворителей рассчитаны величины R_f , H , N (табл.2.). Поскольку системы 4 и 5 не позволяют провести определение эргокальцеферола, дальнейшие исследования в этих системах не проводились.

Из табл.2 следует, что самые высокие величины N , следовательно, и наибольшая эффективность хроматографирования и лучшее качество зон для эргокальцеферола наблюдается в предложенной нами системе 1, где форма пятна соответствует линейной изотерме сорбции.

Для эргокальцеферола в качестве проявителя рекомендуются кислота серная концентрированная, смесь ванилина 1% и кислоты фосфорной 50% [13]. Наиболее эффективным проявителем оказался раствор кислоты серной. Он обеспечивает достаточно высокую контрастность зон эргокальцеферола и фона пластины, обнаруженные пятна витамина D_2 не обесцвечиваются при хранении хроматограмм (в отличие от смеси ванилина 1% и кислоты фосфорной 50%), что важно для дальнейшей обработки пластин в количественном анализе.

Количественный анализ эргокальцеферола проводили с применением компьютерной программы «Sorbfil Videodensitometer».

По полученным данным градуировочные зависимости площади зоны от концентрации компонентов. Для эргокальцеферола уравнение выглядит следующим образом $S = (126,29 \pm 73,3453) \cdot c + (3,1018 \pm 0,04279)$, где $R^2 = 0,9998$.

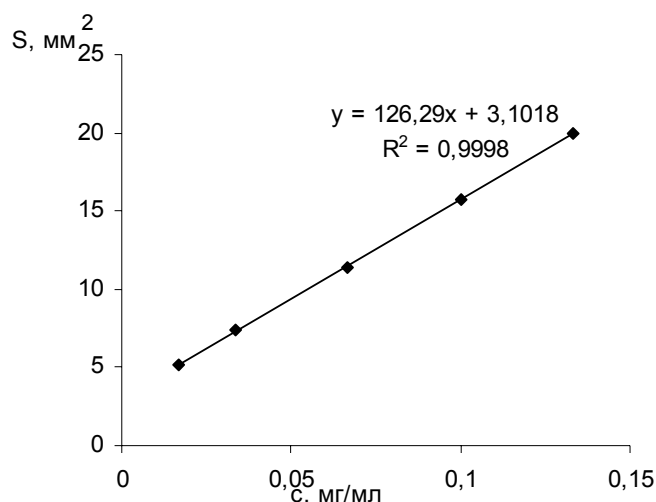


Рис.2 Градуировочные зависимости площади зоны от концентрации эргокальцеферола

Как видно из рис. 2 градуировочные зависимости в данном интервале концентраций имеют линейный характер, таким образом, они могут быть использованы для количественного определения витамина D₂.

В дальнейшем нами была произведена статистическая обработка результатов. Суммарная ошибка хроматографического определения эргокальциферола не превышает 7,5 % (по научной документации ошибка не должна превышать 10 %). Таким образом, разработанная нами методика хроматографии в тонком слое сорбента с применением компьютерной программы «Sorbfil Videodensitometer» для количественной оценки данных является универсальной, специфичной и отвечает основным метрологическим характеристикам.

Список литературы.

1. Колотилова А. И., Глушанков Е. П. Витамины (химия, биохимия и физиологическая роль) / А.И. Колотилова, Е.П. Глушанков -. Л.: Издательство Ленинградского университета, 1976.-248 с.
2. Герег Ш. Количественный анализ стероидов / Ш. Герег - М: Мир, 1985. - 504с.
3. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Кирхнер - М.: Мир, 1981. - 616с.
4. Экспериментальная витаминология / под ред. Ю. М Островского. - Мн.: Наука и техника, 1979.-552 с.
5. Рудаков О. Б., Селеменев В. Ф. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. / О.Б. Рудаков, В.Ф.Селеменев. - Воронеж: Изд-во "Водолей", 2004. - 528 с.

Optimization of the conditions of the determination of vitamin D₂ by thin-layer chromatography

T.A. Kitaeva, E.V. Borodina, E.F. Safonova, V.F. Selemenev
Voronezh State University

The determination of the optimum conditions for the identification and quantitative determination of vitamin D₂ by thin-layer chromatography was carried out. The possibility of the application of the computer program "Sorbfil Videodensitometer" for the treatment of obtained chromatograms was shown. The calibration between the square of chromatographic zones and concentration was established. The developed technique was applied for the determination of vitamin D₂ in vegetable oils.

Ключевые слова: витамин D₂, ТСХ, растительные масла, Sorbfil Videodensitometr