



УДК 543.544

## Выявление возможностей сорбента Purosep-200 на основе сверхсшитого полистирола при анализе водо- и жирорастворимых витаминов

Руденко А.О., Карцова Л.А.

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург*

Даванков В.А.

*Институт элементарных органических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва*

Поступила в редакцию 13.05.2009 г.

### Аннотация

Сверхсшитые полистирольные сорбенты успешно используются в твёрдофазной экстракции (ТФЭ), а недавно нашли применение также и в колонках для высокоэффективной жидкостной хроматографии. В данной работе выявлены возможности сверхсшитого сорбента Purosep-200 при анализе водо- и жирорастворимых витаминов в объектах сложного растительного происхождения (кормах, комбикормах и биологически-активных добавках). Получены значения коэффициентов извлечения витаминов и предложен способ очистки и концентрирования экстрактов реальных объектов. Проведена сравнительная характеристика сорбента Purosep-200 и модифицированного силикагеля (С18) при анализе витаминов.

**Ключевые слова:** Высокоэффективная жидкостная хроматография, твёрдофазная экстракция, сверхсшитый сорбент, обращено-фазовый сорбент, водорастворимые витамины, жирорастворимые витамины, витамины В1, В2, В6, В3, А, D2, D3, Е.

Hypercrosslinked polystyrene adsorbents are successfully used in solid-phase extraction (SPE). Also it has been recently shown, that this adsorbents can be used as a packing material for high performance liquid chromatography column. In this work possibilities of hypercrosslinked adsorbent Purosep-200 in the analysis of water- and fat-soluble vitamins in complex matrixes (forages, mixed fodders and biologically-active additives) are revealed. The recovery values of vitamins have been obtained and method of clearing and concentration of extracts of real objects has been suggested. The comparative characteristic of Purosep-200 and modified silica (C18) in the analysis of vitamins has been carried out.

**Keywords:** High performance liquid chromatography, solid-phase extraction, hypercrosslinked adsorbent, reversed-phase adsorbent, water-soluble vitamins, fat-soluble vitamins, vitamins B1, B2, B6, B3, A, D2, D3, E.

### Введение

Анализ органических веществ таких, как витамины и аминокислоты в растительных объектах и биологических жидкостях методом ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием представляет весьма сложную задачу из-за

наличия большого числа сопутствующих компонентов и, как следствие, перегруженности хроматографического профиля. Всё это приводит к получению недостоверных результатов и ухудшает пределы обнаружения аналитов. Для решения этой проблемы применяют различные варианты очистки и концентрирования экстрактов. Наиболее часто используемым является метод твёрдофазной экстракции (ТФЭ) целевых компонентов на обращенно-фазовых сорбентах типа C8 и C18, [1 - 4].

В недавнее время в качестве сорбентов для ТФЭ и жидкостной хроматографии были предложены новые полимерные материалы [5 - 7]. Однако сорбенты такого типа не заняли достойного места в жидкостной хроматографии, по сравнению, например, ещё с модифицированным силикагелем. Основной причиной этого является плохая осведомленность и непонимание со стороны многих пользователей особенностей механизма сорбции и удерживания на сверхсшитых полимерных сорбентах. Механизм сорбции и удерживания подробно описан Даванковым и сотр. в работах [8,9]. При этом в отличие от прочих полимерных материалов, сверхсшитые полистирольные сорбенты могут обладать как микро-, так и макропорами, имеют удельную площадь поверхности более  $1000 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$  и активно вступают в  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия с определяемыми соединениями [10]

Одной из интересных особенностей этих полимерных сорбентов является их способность набухать как в полярных, так и в неполярных растворителях, а также крайне низкая плотность (т.е. высокая пористость) в сухом состоянии. Тенденция к набуханию и особый вид пористости позволяют сверхсшитому полистиролу проявлять превосходные адсорбционные характеристики при анализе как полярных, так и неполярных органических веществ [11]. Кроме характерных для сверхсшитого полистирола нанопор размером 20-40 Å, этот материал имеет ещё и широкие транспортные поры размером в несколько сотен Å.

Наиболее широко изученной сферой применения этих сорбентов на сегодняшний день является анализ конденсированных ароматических углеводородов, например, нафталина или соединений фенольного ряда в сточных и питьевых водах [12,13]. К тому же сверхсшитые сорбенты широко используются для удаления пестицидов из воды [14], а также сорбции паров органических растворителей (алканов, ацетона, метанола) [15].

Цель настоящей работы – выявление возможностей сверхсшитого полистирольного бипористого сорбента Purosep-200 для анализа водо- и жирорастворимых витаминов в объектах сложного растительного происхождения (кормах, комбикормах, биологически-активных добавках).

## Эксперимент

**Аппаратура.** Определение витаминов проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (Япония) с ультрафиолетовым детектированием в режиме градиентного элюирования; хроматографическая колонка 120x2.1 мм Supelco Discovery C18 зернением 5 мкм (США); подвижная фаза – ацетонитрил- и фосфатный буфер (рН 2,5, 11,5 mM). Использовали стандартные образцы следующих витаминов («Sigma», США): никотиновая кислота (B3 или PP), никотинамид (B3 или PP), пиридоксин гидрохлорид (B6), рибофлавин (B2), тиамин гидрохлорид (B1), холекальциферол (D3), эргокальциферол (D2), ретинол ацетат (A), токоферол ацетат (E) (Рис. 1).

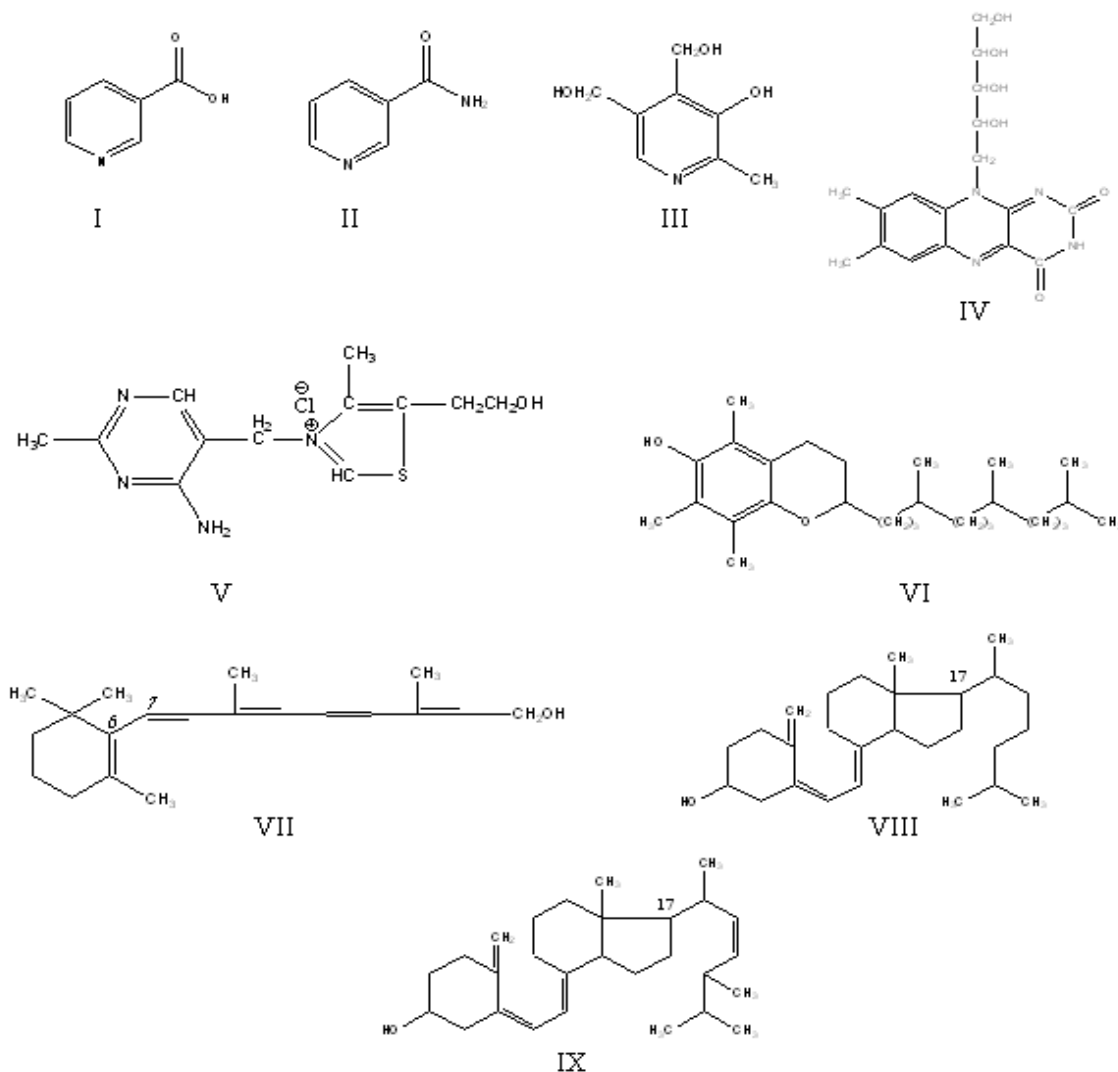


Рис. 1. Структуры определяемых водо- и жирорастворимых витаминов.

I – никотиновая кислота, II – никотинамид, III – пиридоксин, IV – рибофлавин, V – тиамин, VI – токоферол, VII – ретинол, VIII – холекальциферол, IX – эргокальциферол.

В работе использовали бидистиллированную воду, метанол (х.ч.) («Вектон», Россия), сорбенты для твёрдофазной экстракции Purosep-200 и Sep-Pak C18.

Готовили индивидуальные растворы определяемых соединений с концентрацией ~ 5 ppm. Оптимизировали условия хроматографического разделения отдельно водо- и жирорастворимых витаминов. Значения площадей пиков использовали для последующего расчёта коэффициентов извлечения витаминов.

Далее 100 мг сорбентов для ТФЭ (Purosep-200 и Sep-Pak C18) помещали в подготовленные стеклянные трубки (диаметр 3 мм, длина 150 мм). Сорбенты готовили к работе следующим образом: Purosep-200 промывали 10 мл хлористого метилена, 5 мл метилового спирта и 3 мл бидистиллированной воды; Sep-Pak C18 промывали 10 мл метанола и затем 10 мл бидистиллированной воды.

1 мл раствора водорастворимых витаминов вносили в подготовленные указанным образом сорбционные трубки. Растворы пропускали через сорбенты со скоростью ~ 0,5 мл/мин, и по окончании - сорбенты промывали 1 мл бидистиллированной воды и обдували струёй азота. Аналиты элюировали с

сорбентов 5 мл нагретого до 60<sup>0</sup> С метилового спирта. Полученные элюаты собирали в отдельные виалы; растворитель упаривали досуха под струёй азота. Сухие остатки растворяли в 1 мл смеси метанол – вода в соотношении 50 : 50 (объёмн.), и раствор фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

При анализе жирорастворимых витаминов 1 мл метанольного раствора со скоростью ~ 0,5 мл/мин пропускали через подготовленные трубки с сорбентами. Затем сорбенты промывали 1 мл метилового спирта, и аналиты элюировали 10 мл хлористого метилена. Полученные элюаты собирали в отдельные виалы. Растворитель упаривали досуха под струёй азота. Сухие остаток растворяли в 1 мл метанола и фильтровали.

Значения рассчитанных коэффициентов извлечения приведены в табл. 1.

Таблица 1. Значения коэффициентов извлечения водо- и жирорастворимых витаминов при индивидуальном определении на сорбентах Purosep 200 и Sep-Pak C18 (N = 5, P = 0,95)

Соединение	Рибофлавин		Тиамин	
	Purosep 200	Sep-Pak C18	Purosep 200	Sep-Pak C18
Сорбент				
α	0,98 ± 0,02	0.94 ± 0.03	0,89 ± 0,02	0.86 ± 0.06
Соединение	Никотинамид		Никотиновая к-та	
	Purosep 200	Sep-Pak C18	Purosep 200	Sep-Pak C18
Сорбент				
α	0,99 ± 0,02	0.85 ± 0.06	0,99 ± 0,01	0.77 ± 0.04
Соединение	Пиридоксин		Ретинола ацетат	
	Purosep 200	Sep-Pak C18	Purosep 200	Sep-Pak C18
Сорбент				
α	0,94 ± 0,04	0.75 ± 0.06	0,92 ± 0,01	0,68 ± 0,07
Соединение	Холекальциферол		Токоферола ацетат	
	Purosep 200	Sep-Pak C18	Purosep 200	Sep-Pak C18
Сорбент				
α	0,97 ± 0,02	0,71 ± 0,03	0,92 ± 0,03	0,78 ± 0,04
Соединение	Эргокальциферол			
	Purosep 200	Sep-Pak C18		
Сорбент				
α	0,96 ± 0,02	0,71 ± 0,04		

Установлено, что для анализа жирорастворимых витаминов (Табл. 1) более предпочтительным является сорбент Purosep 200.

Далее готовили стандартный раствор водо- и жирорастворимых витаминов известной концентрации, используя в качестве растворителя систему метанол – вода в соотношении 90 : 10 (объёмн.). Были оптимизированы условия совместного определения водо- и жирорастворимых витаминов (градиентное элюирование с использованием в качестве подвижной фазы метанол – раствор фосфорной кислоты: рН 2,0); 1 мл смеси со скоростью ~ 0,5 мл/мин вносили в подготовленную трубку с сорбентом Purosep-200, сорбент промывали 1 мл бидистиллированной воды и обдували струёй азота, и затем проводилось фракционное элюирование аналитов: вначале - смесью метанол : изопропиловый спирт (30 : 70 объёмн.), а затем – хлористым метиленом. Полученные элюаты объединяли и упаривали досуха в токе азота. Сухой остаток растворяли в 1 мл смеси метанол – вода (90 : 10, объёмн.) и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

На рис. 2 представлена хроматограмма смеси водо- и жирорастворимых витаминов после фракционного элюирования.

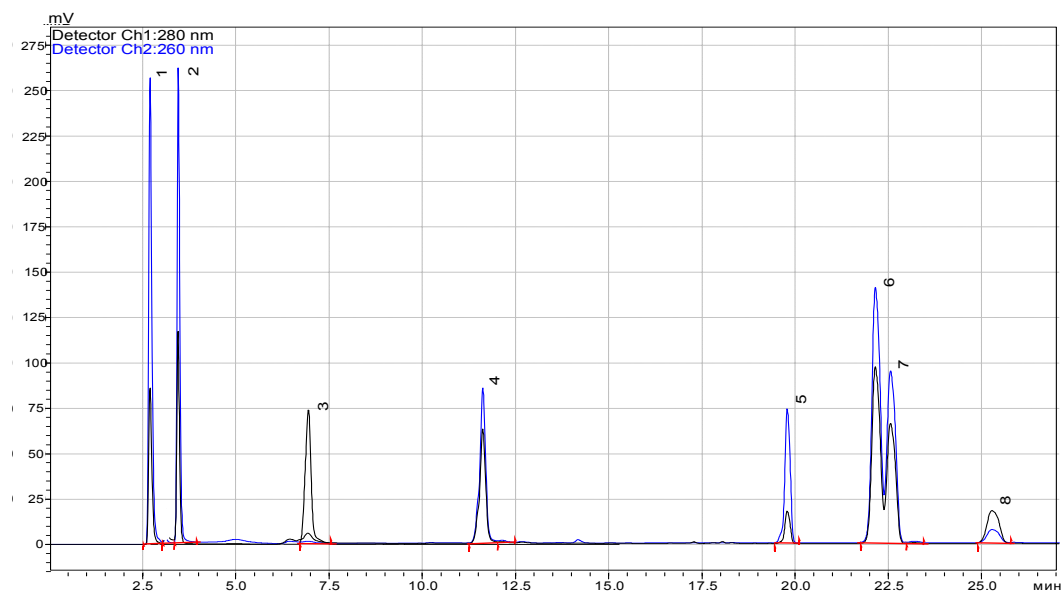


Рис. 2. Хроматограмма стандартной смеси водо- и жирорастворимых витаминов (1-никотиновая кислота, 2-тиамин, 3-пиридоксин, 4-рибофлавин, 5-ретинола ацетат, 6-эргокальциферол, 7-холекальциферол, 8-токоферола ацетат) Прибор: Shimadzu LC-20AD Prominence, детектор диодная матрица. Колонка: Supelco Discovery C18 120 x 2,1, 5 мкм. Элюент: фосфорная кислота (рН=2,0): метанол,  $\lambda$ : 280 и 260/265/328 нм.

На основании полученных хроматографических данных по площадям пиков рассчитывали коэффициенты извлечения витаминов (Табл. 2).

Таблица 2. Коэффициенты извлечения витаминов на сорбенте Purosep 200 при совместном определении (N = 5, P = 0.95)

Витамин	$\alpha$
Никотиновая кислота	0,99 ± 0,01
Никотинамид	0,98 ± 0,04
Пиридоксин	0,93 ± 0,04
Тиамин	0,91 ± 0,03
Рибофлавин	0,97 ± 0,02
Ретинола ацетат	0,93 ± 0,02
Холекальциферол	0,95 ± 0,03
Эргокальциферол	0,94 ± 0,04
Токоферола ацетат	0,90 ± 0,03

В качестве объекта анализа использовали комбикорма, корма и биологически-активные добавки. Пробоподготовка включала жидкостную экстракцию смесью изопропиловый спирт : вода (80:20, объемн.), центрифугирование, очистку и концентрирование экстрактов методом ТФЭ. Для этого навеску корма массой 3 г помещали в коническую колбу на 100 мл и с помощью мерной пипетки добавляли 15 мл смеси изопропиловый спирт : вода (80:20, объемн.). Содержимое колбы перемешивали магнитной мешалкой при температуре 50<sup>0</sup>С в течение 10 мин. После этого колбу охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали в течение 3-

х мин при 8000 об/мин. Далее 7 мл экстракта помещали в подготовленную колонку с сорбентом Purosep-200. Проводили фракционное элюирование витаминов описанным выше способом. Полученные элюаты объединяли и упаривали досуха под струёй азота. Сухой остаток растворяли в 1 мл смеси метанол : вода и фильтровали через мембранный фильтр.

На рис. 3 представлена хроматограмма комбикорма после очистки.

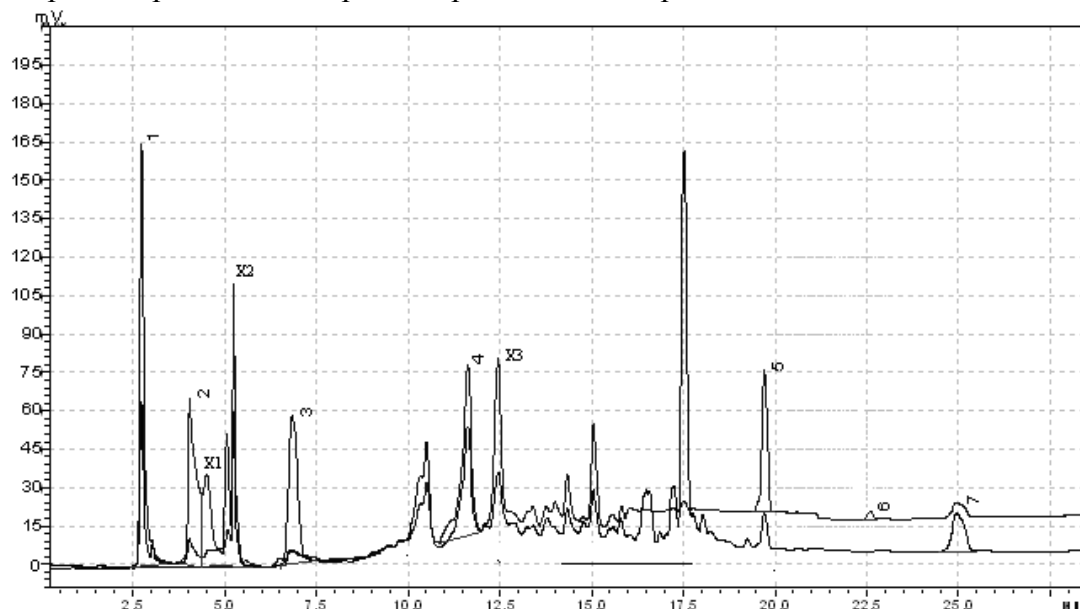


Рис. 3. Хроматограмма экстракта комбикорма ПК-6 после очистки и концентрирования на сорбенте Purosep 200. (1-никотиновая кислота (B<sub>3</sub>), 2-тиамин (B<sub>1</sub>), 3-пиридоксин (B<sub>6</sub>), 4-рибофлавин (B<sub>2</sub>), 5-ретинола ацетат (A), 6-холекальциферол (D<sub>3</sub>), 7-токоферола ацетат (E)). Прибор: Shimadzu LC-20AD Prominence, детектор диодная матрица. Колонка: Supelco Discovery C18 120 x 2,1, 5 мкм. Элюент: фосфорная кислота (pH=2,0) : метанол, λ: 280 и 260/265/328 нм.

## Результаты и их обсуждение

На модельных растворах и реальных объектах выявлены возможности сверхсшитого полистирольного сорбента Purosep-200. Сравнением обращённо-фазового сорбента Sep-Pak C18 и сверхсшитого полимера Purosep-200 показано, что сорбент Purosep-200, благодаря своей более развитой пористой структуре и характерному механизму удерживания ( $\pi$ - $\pi$  взаимодействия с молекулами целевых компонентов), позволяет за один аналитический цикл решить такую сложную аналитическую задачу, как одновременное концентрирование гидрофильных (водорастворимые витамины) и гидрофобных (жирорастворимые витамины) соединений (рис. 2). Высоких коэффициентов извлечения витаминов при совместном определении полярных и неполярных компонентов удалось достичь при использовании фракционного элюирования из сорбента. Применение данного метода десорбции значительно уменьшает время, затрачиваемое на анализ. При аналогичной процедуре пробоподготовки обращённо-фазовые силикагелевые сорбенты не обеспечивают приемлемого извлечения жирорастворимых витаминов (таблица 1). Коэффициенты извлечения, полученные для двух сорбентов, показывают, что сверхсшитый превосходит модифицированный силикагель по сорбционным характеристикам, что и позволило в значительной степени упростить

анализ. Также, существенным достоинством сверхшитого сорбента Purosep-200 является возможность сорбировать витамины как из водных, так и из органических растворителей. При этом извлечение целевых компонентов в обоих случаях превышает 90 % и остаётся практически постоянным.

Анализ сложных объектов, в особенности объектов растительного происхождения, содержащих большое число примесей и сопутствующих компонентов, требует серьёзной пробоподготовки, занимающей до 80 % времени анализа. Проблема анализа растительных объектов в большинстве случаев остаётся нерешённой. Использование сверхшитого сорбента позволило существенно разгрузить хроматографический профиль и снизить влияние мешающих компонентов (рис. 2), а также провести одновременный анализ водо- и жирорастворимых витаминов.

### Список литературы

1. Ekinçi R., Kadakal C. Determination of seven water-soluble vitamins in tarhana, a traditional turkish cereal food, by high performance liquid chromatography // *J. Chrom. A.* 2005. V. 43. P. 289.
2. ГОСТ Р 50929-96 Премиксы. Методы определения витаминов группы В. М.: ИПК Издательство стандартов, 1996. 17 с.
3. Буланова А.В., Полякова Ю.Л. Хроматография в медицине и биологии, Самара: 2006. 105 с.
4. Захарова А.М., Рейнгеверц М.Д. Биологически-активные добавки, премиксы, корма, комбикорма, комбикормовое сырьё. Методика выполнения измерений массовой доли водорастворимых витаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. ФГУП «РНЦ «Прикладная химия»», СПб: 2008.
5. Hennion M.-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography // *J. Chrom.* 1999. V. 856. P. 3-54.
6. Sabik H., Jeannot R., Roudeau B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters // *J. Chrom.* 2000. V. 885. P. 217-236.
7. Leonard M. New packing materials for protein chromatography // *J. Chrom.* 1997. V. 699. P. 3-27.
8. Sychov C.S., Ilyin M.M., Davankov V.A., Sochilina K.O. Elucidation of retention mechanisms on hypercrosslinked polystyrene used as column packing material for high-performance liquid chromatography // *J. Chrom. A.* 2004. V. 1030. P. 17-24.
9. Davankov V.A., Sychov C.S., Ilyin M.M., Sochilina K.O. Hypercrosslinked polystyrene as a novel type of high-performance liquid chromatography column packing material. Mechanisms of retention // *J. Chrom. A.* 2003. V. 987. P. 67-75.
10. Fontanals N., Galia M., Cormack A.G., Marce R.M., Sherrington D.C., Borrull F. Evaluation of a new hypercrosslinked polymer as a sorbent for solid-phase extraction of polar compounds // *J. Chrom. A.* 2005. V. 1075. P. 51-56.
11. Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Porous structure of hypercrosslinked polystyrene: state-of-art mini-review // *J. React & Funct. Polym.* 2002. V. 53. P. 193-203.
12. Long C., Li A., Wu H., Zhang Q. Adsorption of naphthalene onto macroporous and hypercrosslinked polymeric adsorbent^ effect of pore structure of adsorbents on thermodynamic and kinetic properties // *J. Coll. & Surf.* 2009. V. 333. P. 150-155.

13. Li A., Zhang Q., Zhang G., Chen J., Fei Z., Liu F. Adsorption of phenolic compounds from aqueous solutions by a water-compatible hypercrosslinked polymeric adsorbent // J. Chemosph. 2002. V. 47. P. 981-989.

14. Streat M., Sweetland L.A. and F., Graduate. Removal of pesticides from water using hypercrosslinked polymer phases: part 1 – physical and chemical characterization of adsorbents // J. Proc Safety & Environ. Protec. 1998 V. 76. P. 115-126.

15. Rosenberg G.I., Shabaeva A.S., Moryakov V.S., Musin T.G., Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Sorption properties of hypercrosslinked polystyrene sorbents // J. React & Funct. Polym. 1983. V. 1. P. 175-182.

---

**Руденко Андрей Олегович** – аспирант кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

**Карцова Людмила Алексеевна** – д.х.н., профессор кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

**Даванков Вадим Александрович** – д.х.н., Профессор, заведующий лабораторией Института элементоорганических соединений РАН, тел. (499) 135-64-71

**Rudenko Andrey O.** – the post-graduate student of analytic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: [andrew\\_r@inbox.ru](mailto:andrew_r@inbox.ru)

**Kartsova Ludmila A.** – Dr.Sc.Chem. the professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: [kartsova@gmail.com](mailto:kartsova@gmail.com)

**Davankov Vadim A.** – Dr.Sc.Chem., Prof., Head of Department Institute of Organo-Element Compounds, Russ. Acad. Sci., [davank@ineos.ac.ru](mailto:davank@ineos.ac.ru)