



УДК 543.544.943.3.068.9

Определение жирорастворимых витаминов в растительных объектах методом ТСХ

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

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 11.09.2013 г.

Аннотация

На примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной показана возможность определения и разделения жирорастворимых витаминов в лекарственном растительном сырье методом хроматографии в тонком слое сорбента.

Ключевые слова: жирорастворимые витамины, лекарственное растительное сырье, тонкослойная хроматография.

On the example of fruits of a Hippophaes rhamnoides and nettle leaves the two-blast furnace showed possibility of definition and division of fat-soluble vitamins in medicinal vegetable raw materials by a chromatography method in a thin layer of a sorbent.

Keywords: fat-soluble vitamins, medicinal vegetable raw materials, thin layer chromatography

Введение

Важнейшим классом незаменимых пищевых веществ являются витамины. Витамины представляют собой биологически активные органические соединения разнообразной химической природы. Недостаток, как и избыток, витаминов в организме одинаково вредны, так как вызывают глубокие нарушения различных функций организма, что приводит к тяжелым заболеваниям [1, 2].

В настоящее время ассортимент витаминных лекарственных средств представлен достаточно широко. Состав их сложен и многообразен. Жирорастворимые витамины (ЖРВ) применяются как самостоятельные препараты, а также являются важнейшими минорными компонентами лекарственного растительного сырья (ЛРС) и растительных масел на их основе.

Анализ литературных источников свидетельствует об уникальном комплексе биологически активных веществ (БАВ), содержащихся в ЛРС, среди которых важную роль занимают каротиноиды, в частности β -каротин. Совместное присутствие таких ЖРВ, как К, Е, D и провитамина А обеспечивает возникновение синергизма лечебного эффекта. Синтетические аналоги этих витаминов не могут сравниться с их высокоактивными нативными формами, присутствующими в ЛРС [1, 2].

Известны способы идентификации, разделения и количественного определения ЖРВ в субстанции, одно- и многокомпонентных лекарственных формах, премиксах, биологически активных добавках, культурах микроорганизмов

методом ВЭЖХ. Недостатком ВЭЖХ является нехватка квалифицированных кадров, дорогостоящего оборудования, реактивов и материалов, а также стандартных образцов [3-7].

Нашли широкое применение также спектральные методы анализа. Фотоэлектроколориметрия, основанная на измерении оптической плотности растворов исследуемых витаминов после добавления каких-либо цветореагентов, образующих окрашенные продукты реакции. Прямая и дифференциальная спектрофотометрия находят широкое применение в анализе субстанций для контроля подлинности, степени чистоты и количественного содержания. Недостатками указанных спектральных способов являются: громоздкость и длительность определений, нестабильность окрашенных продуктов цветных реакций, недостаточная чувствительность и селективность, невозможность определения витаминов E, D₂ и β-каротина при совместном присутствии без предварительного разделения [8-11].

ТСХ, обладая всеми преимуществами хроматографических методов, находит широкое применение в виду своей экспрессности, доступности, достаточной чувствительности, селективности, малой стоимости и простоте выполнения анализа [12, 13].

В настоящее время, согласно нормативной документации (НД) ЛРС не стандартизируется по содержанию ЖРВ, составляющих липофильную фракцию [8-10]. Однако, необходимо учитывать данный показатель при разработке новых проектов и изменении уже существующих фармакопейных статей на ЛРС.

Целью настоящей работы являлась разработка методики идентификации ЖРВ в ЛРС методом ТСХ на примере листьев крапивы двудомной и плодов облепихи крушиновидной.

Эксперимент

Объектом исследования являлось измельченное высушенное ЛРС крапивы двудомной отечественного производителя, соответствующее требованиям НД, а также свежие плоды облепихи крушиновидной, собранные в Воронежской области в период полного созревания, согласно правилам заготовки данного вида ЛРС.

Этанол и гексан обладают избирательностью в отношении триглицеридов, фитостеринов, каротиноидов и токоферолов, поэтому данные растворители были выбраны в качестве экстрагентов.

Получение извлечения из листьев крапивы двудомной: около 1 г измельченного сырья (точная навеска) с размером частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл экстрагента (гексан или смесь гексан-этанол (1:1)). Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры. Извлечение фильтруют через несколько слоев марли, отжимая частицы сырья.

Получение извлечения из плодов облепихи крушиновидной: около 10,0 г (точная навеска) плодов облепихи (в пересчете на абсолютно сухое сырье) разминают и помещают в колбу вместимостью 50 мл, заливают 30 мл этанола. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок.

Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры. Извлечение фильтруют через несколько слоев марли, отжимая ЛРС.

Обсуждение результатов

На первом этапе работы была подобрана оптимальная хроматографическая система, позволяющая идентифицировать и разделить ЖРВ. Выбор проявителя осуществляли с учетом таких требований как специфичность, высокая чувствительность, доступность и высокое качество получаемой картины. Для обнаружения пятен эргокальциферола (ФСП 42-0008018000) [7], β -каротина (ВФС 42-3128-98) [14] и токоферола ацетата (ФС 42-7843-97) [6], которые выбраны в качестве стандартных образцов, были использованы реагенты, предложенные в литературе [1, 2, 8-13]: конц. азотная кислота; 70 % раствор хлорной кислоты и 5% спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты (ФМК). В результате установлено, что первый проявитель обнаруживает только хроматографические зоны витамина Е (красно-оранжевого цвета на белом фоне), второй – только зоны эргокальциферола (размытые оранжево-красные зоны на белом фоне) и β -каротина (быстроисчезающие зоны на белом фоне). ФМК – проявляет все исследуемые ЖРВ (темно-синие зоны на желто-зеленом фоне). Идентификацию на хроматограмме β -каротина возможно проводить в видимом свете по характерному желто-оранжевому окрашиванию зон. Детектирующим реагентом, отвечающим всем требованиям, является 5% спиртовой раствор ФМК. Идентификация хроматографических зон после разделения осуществлялась в видимом и УФ-свете, а также при помощи выбранного реагента. Зоны проявлялись на хроматограммах в виде синих пятен на желто-зеленом фоне.

В эксперименте изучены элюирующие системы с различными значениями полярности, чаще всего предлагаемые в литературе для разделения и идентификации ЖРВ [1-2, 12-13]. В работе использовались растворители и реактивы марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург). Лучшее разделение и качество хроматографических зон достигнуто в системе гексан-хлороформ (3:1), поэтому она выбрана для идентификации ЖРВ в извлечениях из ЛРС. Для выбранной хроматографической системы были рассчитаны величины относительных скоростей перемещения в тонком слое, коэффициенты селективности сорбции (L) и распределения (K) для стандартных образцов ЖРВ (табл. 1). Результаты свидетельствуют об удовлетворительном разделении хроматографических зон на хроматограмме и правомерности использования данной системы [15]. Вид полученных хроматограмм представлен на рис. 1.

Таблица 1. Хроматографические параметры ЖРВ

№ п/п	ЖРВ	R_f	K	L
1	эргокальциферол	0.65±0.03	0.54	1.93
2	Токоферола ацетат	0.78±0.02	0.28	28
3	β -каротин	0.99±0.01	0.01	

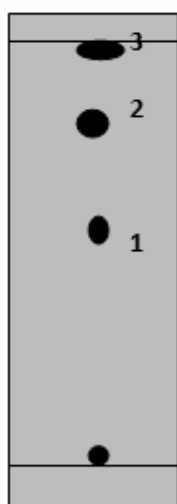


Рис. 1. Вид хроматограммы стандартных образцов жирорастворимых витаминов: 1 – витамин D₂; 2 – витамин E; 3 – β-каротин.

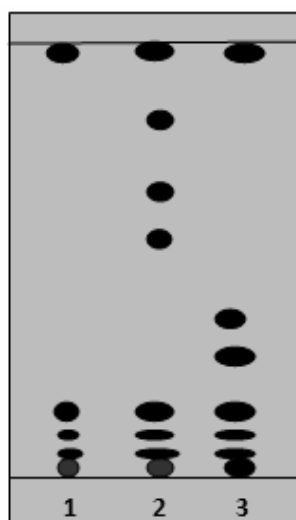


Рис. 2. Вид хроматограммы извлечений из листьев крапивы двудомной после проявления 5% спиртовым раствором ФМК: 1 – объем пробы 40 мкл; 2 – объем пробы 100 мкл гексанового извлечения; 3 – объем пробы 100 мкл извлечения (гексан-этанол 1:1)

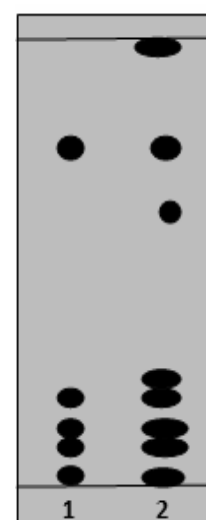


Рис. 3. Вид хроматограммы извлечения из плодов облепихи крушиновидной после проявления 5% спиртовым раствором ФМК: 1 – объем пробы 40 мкл; 2 – объем пробы 100 мкл.

На следующем этапе работы полученные извлечения из исследуемого ЛРС наносили на стартовую линию хроматографических пластин марок «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А, ПТСХ-П-В и ПТСХ-П-А-УФ в количествах 40 и 100 мкл. Оптимальный объем пробы составил 100 мкл. Вид полученных хроматограмм представлен на рис. 2 и 3. Идентификация зон на хроматограммах представлена в табл. 2.

На хроматограммах извлечений из исследуемого ЛРС при использовании гексана и этанола в качестве экстрагентов (объем пробы 100 мкл) обнаружено восемь зон. Как видно из рис. 2 и 3, на хроматограммах семь хроматографических зон являются общими со значениями величин $R_f = 0,01 \pm 0,02$; $0,04 \pm 0,02$; $0,10 \pm 0,02$; $0,16 \pm 0,02$; $0,65 \pm 0,02$; $0,79 \pm 0,01$; $0,99 \pm 0,01$. Для извлечения из листьев крапивы двудомной наблюдалась специфическая зона со значением $R_f = 0,58 \pm 0,02$. При анализе извлечения из плодов облепихи обнаружена характерная зона с величиной $R_f = 0,19 \pm 0,01$. В связи с этим мы предполагаем, что хроматографический профиль извлечений из ЛРС можно использовать для его стандартизации. В связи с тем, что в извлечениях, полученных с применением смеси гексан-этанол (1:1), не идентифицированы зоны витаминов D₂ и E (рис. 2, точка 3), обсуждение полученного хроматографического профиля не приводим.

Для каждой хроматографической зоны были рассчитаны величины относительных скоростей перемещения в тонком слое, коэффициенты распределения (K) и селективности сорбции (L) (табл. 2). В сравнении с достоверными стандартными образцами по величинам R_f идентифицированы зоны витаминов D₂, E и β-каротина.

Таблица 2. Идентификация хроматографических зон на хроматограммах

№ зоны	Rf±0,02	K	L	Окраска в видимом свете	Окраска в УФ-свете (365нм)	Идентификация вещества	
Извлечение из листьев крапивы двудомной, полученное с применением гексана (ПТСХ-П-В)							
1	0.01	99.00	4.13	-	-	-	
2	0.04	24.00	2.67				
3	0.10	9.00	1.59				
4	0.15	5.67	7.88				
5	0.58	0.72	1.47				
6	0.67	0.49	1.96				
7	0.80	0.25	25.00				Витамин D ₂
8	0.99	0.01				оранжевая	-
Извлечение из листьев крапивы двудомной, полученное с применением смеси гексан-этанол (1:1); ПТСХ-П-А-УФ							
1	0.01	99.00	6.32	-	-	-	
2	0.06	15.67	1.94	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b	
3	0.11	8.09	1.32	темно-зеленая	розовая	хлорофилл a	
4	0.14	6.14	1.17	зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл	
5	0.16	5.25	1.57	-	-	-	
6	0.23	3.35	3.35				
7	0.99	0.01					оранжевая
Извлечение из плодов облепихи крушиновидной, полученное с применением этанола (ПТСХ-АФ-А)							
1	0.01	99.00	6.32	-	-	-	
2	0.06	15.67	1.94				
3	0.11	8.09	1.66				
4	0.17	4.88	1.15				
5	0.19	4.26	7.22				
6	0.63	0.59	2.11				Витамин D ₂
7	0.78	0.28	28				Витамин E
8	0.99	0.01				оранжевая	-

Заключение

Таким образом, предложена методика определения и разделения жирорастворимых витаминов β-каротина, D₂ и E методом ТСХ при совместном присутствии в извлечениях из ЛРС на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной. Проведена идентификация зон на хроматограммах. В изучаемом ЛРС с помощью разработанной методики обнаружены ЖРВ. Установлена целесообразность стандартизации плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной по содержанию ЖРВ методом ТСХ. Хроматографический профиль извлечений из ЛРС можно использовать для оценки его подлинности и доброкачественности.

Список литературы:

1. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю. М. Островского // Минск: Наука и техника, 1979. С. 80-129.
2. Мелентьева Г.А. Фармацевтическая химия некоторых природных веществ с сильным биологическим действием. М.: Изд-во мед. института им. И.М. Сеченова, 1984. С. 48-56.
3. 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.
4. Козлов Э. И., Солунина И.А., Любарева М. Л., Надточий М.А. Определение витаминов А, D, Е в поливитаминных препаратах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии // Хим.-фарм. журн. 2003. Т. 37. № 10. С. 50-53.
5. ФС 42-1699-95 Аевит в капсулах.
6. НД 42-7843-97 Витамин Е в капсулах.
7. ФСП 42-0008018000 Эргокальциферол раствор в масле 0,5 %.
8. Государственная фармакопея X изд. М.: Медицина, 1968.
9. Государственная фармакопея XI изд. М.: Медицина, 1990. Вып. 2.
10. Государственная фармакопея Российской Федерации XII изд. – Часть 1. М.: Изд-во: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения, 2008. 704 с.
11. ФС 42-2798-99. Таблетки «Глутамевит», покрытые оболочкой.
12. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М.: «Мир», 1981. С. 402-407.
13. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М.: Мир, 1980. Т. 2. С. 610.
14. ВФС 42-3128-98. Драже бета-каротина 0,0025.
15. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М.: Мир. 1999. 405 с.

Тринеева Ольга Валерьевна – к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Сафонова Елена Федоровна - к.х.н., доцент, заведующая кафедрой фармации последипломного образования ВГУ, Воронеж

Сливкин Алексей Иванович - д.фарм.н, профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Trineeva Olga V. - the candidate pharm. sciences, the senior lecturer to faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh, trineevaov@mail.ru

Safonova Elena F. - the candidate chem. sciences, the senior lecturer, manager of chair of pharmacy of post-degree formation of VGU, Voronezh

Slivkin Alexey I. - the doctor pharm. sciences, the professor, manager of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, the dean of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh