

УДК 543.257.063

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИННОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ ПЕРГИ МЕТОДОМ ВЭЖХ

*С.Ю. Гармонов, Л.Т. Ахметова, И.А. Салахов, И.В. Зеваков,  
Р.Н. Исмаилова, Э.А. Иртуганова*

### Аннотация

Установлены условия разделения и количественного определения 10 водорастворимых витаминов и 3 жирорастворимых витаминов на сорбенте с фазой С18 без традиционного применения ион-парных реагентов. Исследован витаминный состав биологически активной добавки «Винибис С», которая производится из продуктов пчеловодства на основе субстанции перги.

**Ключевые слова:** высокоэффективная жидкостная хроматография, перга, контроль качества.

### Введение

Витамины являются биологически активными соединениями, участвующими в важных физиологических процессах организма [1]. Препараты на их основе получили широкое применение в фармации. Перга представляет собой цветочную пыльцу, собранную пчелами, ферментированную и упакованную ими в соты на хранение [2]. Привлекательным в этой субстанции является уникальное разнообразие нутриентов (аминокислот, витаминов, микроэлементов и др.), их естественная сбалансированность, биодоступность и взаимный синергизм, что в совокупности обеспечивает ее исключительную эффективность в устранении проявлений дефицита по незаменимым факторам питания. Биологически активная добавка к пище «Винибис С», производимая из перги, обладает рядом уникальных иммуномодулирующих свойств, что обусловлено наличием в ее составе комплекса витаминов и минеральных элементов.

Перспективность использования этих невостребованных продуктов пчеловодства в медицине обусловлена также возможной минимизацией их токсических эффектов для млекопитающих, что объясняется сходным химическим составом биологически активных веществ живых организмов, а также определенным сродством метаболизма растительной и животной клеток. Актуальной в связи с этим представляется разработка способов определения витаминного состава и биохимических свойств высокоэффективных субстанций на основе перги и мервы. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) как универсальный и высокочувствительный метод анализа позволяет провести определение водо- и жирорастворимых витаминов в сложных по составу объектах

природного происхождения, отличаясь при этом высокой точностью и воспроизводимостью [3–5].

Однако в процессе разработки и оптимизации методик анализа витаминных препаратов необходимо учитывать ряд важных моментов. Они связаны с физико-химическими и хроматографическими свойствами объектов анализа, с необходимостью выбора универсальной подготовки пробы, так как объекты обладают различной растворимостью и устойчивостью в растворах, со сложностью подбора неподвижной (НФ) и подвижной (ПФ) фаз для приемлемого разделения, поскольку ряд компонентов обладает близкими хроматографическими свойствами. Часть витаминов представлена высокогидрофильными соединениями, слабоудерживаемыми на наиболее распространенных гидрофобных фазах, поэтому широкий диапазон количественного содержания витаминов приводит к сложности одновременного определения компонентов с низким содержанием в пробе на фоне высокой концентрации других компонентов. Отсюда и дополнительное усложнение пробоподготовки и методики анализа, и необходимость выбора рабочих условий детектирования, так как компоненты присутствуют в разных содержаниях в пробе.

В связи с этим цель исследования состояла в разработке способов определения водо- и жирорастворимых витаминов в субстанции на основе перги с использованием обращенно-фазной ВЭЖХ.

### 1. Экспериментальная часть

Применяли жидкостные хроматографы: LC-20 фирмы Shimadzu (Япония) с диодно-матричным и флуоресцентным детекторами; SERIES 200 фирмы Perkin Elmer (США) с УФ-детектором. Использовали спектрофотометр SPECORD 40 (AnalytikJena, Германия), рН-метр 211 (Hanna, Румыния), центрифугу Minispin Plus (Eppendorf, Германия), ультразвуковую ванну L-0,16/18 (Россия), установку для получения сверхчистой воды Simplicity Millipor (Франция).

В качестве стандартов определяемых веществ использовали стандартные образцы (Fluka и Sigma). Для приготовления элюентов использовали ацетонитрил для хроматографии ос. ч. сорт 0 (Криохром, г. Санкт-Петербург), ацетонитрил Lab-scan марки Ultra Gradient (Ирландия) и сверхчистую воду, полученную на установке MilliporWaters (США) из бидистиллированной воды. Пробоподготовка проводилась по стандартным методикам [6].

### 2. Результаты и их обсуждение

Существующие способы анализа поливитаминных препаратов в большинстве своем используют ион-парные реагенты (ИПР) на основе алкилсульфонатов с алкильными цепями  $C_6$ – $C_8$  в кислой среде ПФ [4]. В этом случае наряду с преимуществами в виде повышения эффективности разделения и улучшения формы пика имеются недостатки. К ним относятся высокая стоимость, сложная подготовка элюента, длительное уравнивание колонки, негативное влияние ИПР на хроматографическую колонку за счет необратимой сорбции модификатора, а также сложность использования градиентного режима элюирования.

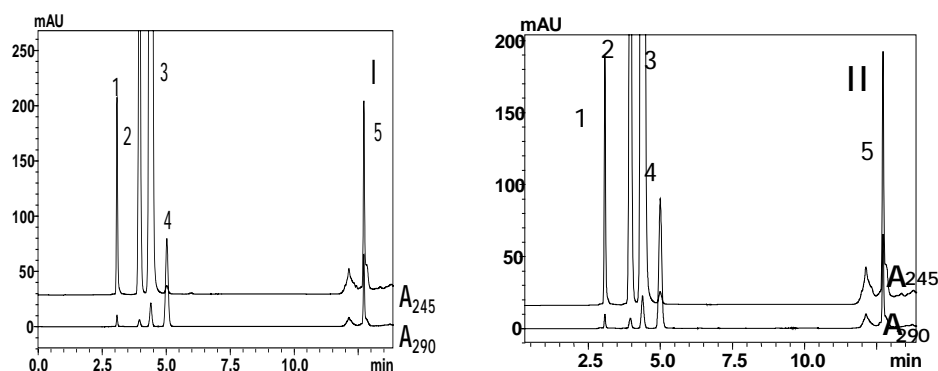


Рис. 1. Хроматограммы витаминов в смеси (I) и таблетках «Гексавит» (II): В<sub>1</sub> – 10 мкг/мл (1), РР – 75 мкг/мл (2), С – 350 мкг/мл (3), В<sub>6</sub> – 10 мкг/мл (4), В<sub>2</sub> – 10 мкг/мл (5). ПФ: А – 0.02 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, рН 2.3, Б – ацетонитрил, 0.2% Б 5 мин, градиент Б 0.2 → 70% за 3 мин, 70% Б 6 мин. Discovery RP Amide C16. 35 °С

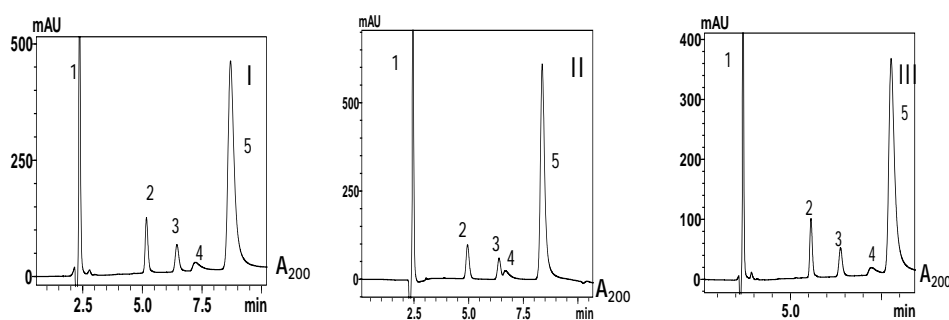


Рис. 2. Хроматограммы смеси витаминов: С – 300 мкг/мл (1), В<sub>5</sub> – 30 мкг/мл (2), В<sub>6</sub> – 10 мкг/мл (3), В<sub>1</sub> – 7 мкг/мл (4), РР – 90 мкг/мл (5). ПФ А: 0.02 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, рН 6.7 (I); рН 6.5 (II); рН 6.9 (III), Б: ацетонитрил : метанол (1 : 1 об.), 2% Б 10 мин, градиент Б 2 → 30% за 8 мин. Symmetry C18. 40 °С

Ряд витаминов является высокополярными соединениями. На их удержание и разделение большое значение оказывает рН ПФ и вид сорбента. В кислой среде унифицируемой ПФ витамины С, В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, РР имеют низкие значения коэффициента емкости и недостаточную степень разделения пар витаминов В<sub>1</sub> и С; РР и В<sub>1</sub>; РР и С на различных сорбентах. Приемлемую для количественного определения степень разделения гидрофильных витаминов удалось получить лишь на колонке Discovery RP Amide C16 при кислом значении рН ПФ (рис. 1).

Изменяя значения рН от 4.0 до 6.9 в ПФ на основе фосфатного буфера, было проведено изучение хроматографических характеристик разделения витаминов С, В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, РР, В<sub>5</sub>, В<sub>2</sub> на сорбенте Symmetry C18 (рис. 2). Оптимального разделения всей группы витаминов удалось добиться лишь при рН 6.7. Однако пик тиамина при этом обладает недостаточной симметрией и нестабильным временем удерживания. Для смещения времени удерживания тиамина из зоны элюирования пиридоксина и никотинамида в ПФ добавлен ДДС в концентрации 0.001 М в нейтральной среде. В итоге реализована экспрессная методика анализа витаминов С, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>, РР, В<sub>2</sub>.

Табл. 1

Режим градиентного элюирования при разделении витаминов с добавками модификаторов ПФ (скорость потока 1 мл/мин)

Время, мин	Элюент А: 1% ДЭА, 1% ТЭА, Н <sub>3</sub> РО <sub>4</sub> рН 6.7; %	Элюент Б: СН <sub>3</sub> CN, %	Элюент В: метанол, %
0–5	98	0	2
5–12	98 → 90	0 → 1	2 → 9
12–14	90 → 84	1 → 5	9 → 11
14–19	84 → 70	5 → 15	11 → 15
19–25	70	15	15
25–35	98	0	2

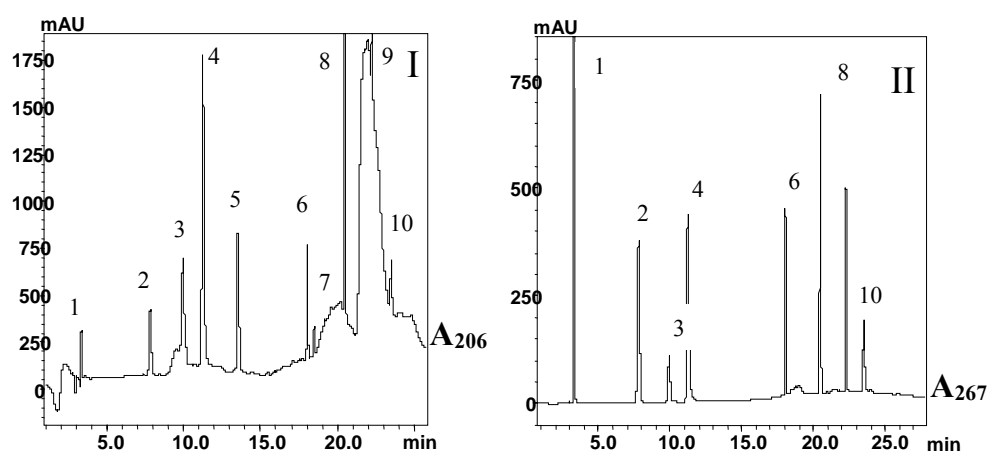


Рис. 3. Хроматограмма смеси витаминов (I – 206 нм, II – 267 нм, мкг/мл): С – 1 (100), В<sub>1</sub> – 2 (100), В<sub>6</sub> – 3 (75), РР – 4 (100), В<sub>5</sub> – 5 (250), В<sub>с</sub> – 6 (50), Н – 7 (100), В<sub>12</sub> – 8 (100), В<sub>2</sub> – 9 (20), Р – 10 (30). Discovery HS C18. Условия см. табл. 1

При дальнейшем улучшении элюационных свойств тиамин и разделении сложной смеси витаминов было установлено, что добавление модификаторов триэтиламина (ТЭА) и диэтиламина (ДЭА) в больших количествах в нейтральной среде аналогично действию ИПР. По этой причине предложен элюент на основе относительно высоких концентраций этих модификаторов (на уровне 1%) при нейтральном значении рН ПФ (табл. 1).

В результате улучшились симметрия и воспроизводимость времен удерживания тиамин, изменилась селективность разделения для витамина В<sub>5</sub>, который элюируется после витаминов С, В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, РР (рис. 3). Найденные условия позволяют проводить определение 10 витаминов (табл. 2) и подтверждены хорошими метрологическими и валидационными параметрами (табл. 3).

Хотя получено разделение для всех компонентов, витамины В<sub>с</sub>, Н, В<sub>12</sub> не могут быть определены вместе с остальными, так как они содержатся в значительно меньших содержаниях и требуют иную подготовку пробы. Обычно эти витамины определяются трудоемкими и неточными микробиологическими

Табл. 2

Характеристики методики анализа гидрофильных витаминов в нейтральной ПФ на основе алкиламинов

Витамины	Длина волны, нм	Диапазон, мкг/мл	Наклон	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
С	300	150–500	5261	1653	0.9978
В <sub>5</sub>	206	5–50	12608	1911	0.9994
В <sub>6</sub>	324	5–100	53085	2032	0.9994
В <sub>1</sub>	267	5–100	29581	1057	0.9992
В <sub>2</sub>	445	5–100	45803	1412	0.9997
РР	262	25–250	33258	1921	0.9993
Р	362	10–150	31300	1749	0.9998

Табл. 3

Пригодность хроматографической системы для анализа витаминов в нейтральной среде (*n* = 10, длина волны 206 нм)

Витамины	Время удерживания, мин	Симметрия пика	Разделение (разрешение между пиками)	Разделение (селективность)	Фактор удерживания	RSD% <i>t</i> <sub>уд</sub>	RSD% <i>S</i> пика
С	3.30	1.574	–	0.000	0.652	0.28	2.31
В <sub>1</sub>	7.79	1.059	26.53	4.447	2.899	0.74	0.65
В <sub>6</sub>	9.93	0.976	8.41	1.368	3.966	0.82	0.43
РР	11.22	1.294	5.38	1.164	4.614	0.29	0.77
В <sub>5</sub>	13.50	1.397	9.21	1.247	5.733	0.30	0.47
В <sub>с</sub>	18.05	1.068	24.93	1.395	8.026	0.95	0.33
Н	18.50	0.991	3.86	1.030	8.250	0.89	0.86
В <sub>12</sub>	20.51	1.041	15.01	1.130	9.256	0.96	0.95
В <sub>2</sub>	22.26	1.101	11.40	1.095	10.134	0.90	0.68
Р	23.51	1.135	8.31	1.066	10.756	0.72	0.33

методами. Было показано, что хроматографическое разделение витаминов В<sub>с</sub> и Н возможно в ПФ на основе фосфатного буфера. Определение витамина В<sub>12</sub> реализовано в ПФ на основе алкиламинов в нейтральной среде за счет его селективного поглощения в длинноволновой области спектра при 361 нм совместно с определением остальных витаминов, несмотря на его низкое содержание витамина В<sub>12</sub> в образце. Используя диодноматричное детектирование, реализовали простую методику одновременного количественного определения жирорастворимых витаминов, несмотря на то что содержания витаминов Д<sub>2</sub> и Е могут значительно отличаться (рис. 4).

Исследования показали, что в «Винибис С» содержатся витамины, приведенные в табл. 4. В перге содержатся жирорастворимые – ретинол, кальциферол, токоферол и водорастворимые витамины, в том числе аскорбиновая кислота, витамины группы В, биотин, витамин Р. Ежедневное употребление 5–6 г перги в течение трех недель создает необходимые запасы витамина А в организме человека на период, когда поступление каротиноидов с другими источниками питания ограничено.

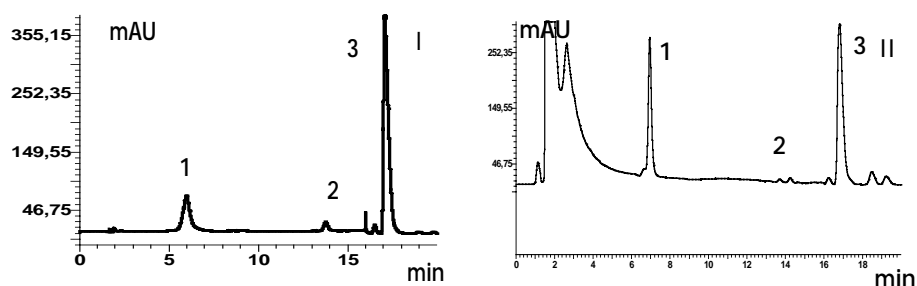


Рис. 4. Хроматограммы витаминов в смеси (I) и экстракте перги (II): А – 90.8 мкг/мл (1), D<sub>2</sub> – 1 мкг/мл (2), Е – 3200 мкг/мл (3). ПФ А – ацетонитрил : метанол 50 : 50 по объему, Б – вода, градиент А 98 → 100% за 12 мин, 100% А 8 мин. ДВД 268 нм – 16 мин, 289 нм – 4 мин. Pecosphere C18. 22 °С

Табл. 4

Содержание витаминов в препарате «Винибис С»

Наименование показателя	Содержание в суточной дозе «Винибис С», мкг	Суточная потребность человека
Ретинол	107–200 М.Е.	2667 М.Е.
Кальциферол	55–64	400 мкг
Токоферол	2.6–3.6	8.0 мг
Тиамин	15–33	1.1 мг
Рибофлавин	54–71	1.3 мг
Ниацин	41–76	1.1 мг
Пиридоксин	17–22	1.5 мг
Фолиевая кислота	13–24	0.18 мг
Цианокобаламин	15	2 мкг
Аскорбиновая кислота	70 мкг – 41мг	60 мг
Витамин Р	1.8–2.4	15 мг
Биотин	1.1–2.4	30 мкг

Таким образом, состав среднесуточной дозы биологически активной добавки к пище «Винибис С» (4 г препарата) содержит в себе как водо-, так и жирорастворимые витамины, природная сбалансированность которых не нарушается в процессе технологической обработки.

### Summary

*S.Yu. Garmonov, L.T. Akhmetova, I.A. Salakhov, I.V. Zevakov, R.N. Ismailova, E.A. Irtuganova.* Determination of Vitamin Composition of Biologically Active Substances Based on Beebread by HPLC Method.

The conditions for separation and quantitative determination of 10 water-soluble and 3 fat-soluble vitamins on a sorbent with C18 phase without the traditional use of ion pair reagents have been established. Vitamin composition of the bioactive supplement “Vinibis C” made of beebread has been investigated.

**Key words:** high-performance liquid chromatography, beebread, quality control.

**Литература**

1. *Черевко Ю.А.* Пчеловодство. – М.: АСТ, 2003. – 368 с.
2. *Мегедь А.Г., Полищук В.П.* Пчеловодство. – Киев: Выща шк., 1990. – 325 с.
3. *Kazakevich Y., Lobrutto R.* HPLC for pharmaceutical scientists. – New Jersey: John Wiley, 2007. – 1135 p.
4. *Ahuja S., Dong M.W.* Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. – Amsterdam: Elsevier, 2005. – 679 p.
5. *Lunn G.* HPLC methods for recently approved pharmaceuticals. – New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. – 717 p.
6. Государственная фармакопея СССР: 11-е изд. Вып. 2. Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

Поступила в редакцию  
14.03.12

---

**Гармонов Сергей Юрьевич** – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии, стандартизации и менеджмента качества Казанского национального исследовательского технологического университета.

E-mail: [serggar@mail.ru](mailto:serggar@mail.ru)

**Ахметова Лилия Тимерхановна** – кандидат химических наук, докторант кафедры аналитической химии, стандартизации и менеджмента качества Казанского национального исследовательского технологического университета.

**Салахов Ильгиз Анясович** – кандидат химических наук, провизор-аналитик ГУ «Центр контроля качества лекарственных средств Республики Татарстан», г. Казань.

**Зеваков Игнат Викторович** – аспирант кафедры аналитической химии, стандартизации и менеджмента качества Казанского национального исследовательского технологического университета.

**Исмаилова Румия Няжиповна** – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии, стандартизации и менеджмента качества Казанского национального исследовательского технологического университета.

**Иртуганова Эльмира Анверовна** – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии, стандартизации и менеджмента качества Казанского национального исследовательского технологического университета.