

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ

В.В. Хасанов, К.А. Дычко, Т.Т. Куряева, Е.В. Нестерова

*Томский государственный университет
Российская Федерация, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36
hasanov@xf.tsu.ru*

Поступила в редакцию 4 октября 2012 г.,
после исправлений – 6 мая 2013 г.

Изучены условия подготовки проб и ВЭЖХ разделения при количественном определении аскорбиновой кислоты в объекте со сложной матрицей (кровь). Исследованы процессы деградации аскорбиновой кислоты, влияние стабилизаторов и матрицы пробы на точность определений. Показана возможность определения аскорбиновой кислоты в крови при условии кислотной денатурации с обязательной стабилизацией комплексообразователем и восстановителем. Приведены данные по стабильности аскорбиновой кислоты в водных растворах и образцах из крови.

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, ВЭЖХ, определение в крови.

Хасанов Виктор Вазикович – к.х.н., доцент кафедры органической химии Томского государственного университета.

Область научных интересов: методы исследования антиокислительной активности, ВЭЖХ-МС биологически активных соединений.

Количество опубликованных работ – 75.

Дычко Константин Александрович – к.х.н., доцент кафедры органической химии Томского государственного университета.

Область научных интересов: методы выделения активных соединений из природного сырья, ГХ-МС.

Количество опубликованных работ – 85.

Куряева Татьяна Тимофеевна – ст. преп. кафедры органической химии Томского государственного университета.

Область научных интересов: синтез азотистых соединений, методы ГХ.

Количество опубликованных работ – 83.

Нестерова Елена Вадимовна – магистрант кафедры органической химии Томского государственного университета.

Область научных интересов: стабилизаторы и консерванты в пищевой промышленности, методы ВЭЖХ и КЭ.

Количество опубликованных работ – две.

Введение

Определение аскорбиновой кислоты (АК) в крови человека считается актуальной задачей, поскольку позволяет судить о функционировании защитной системы организма от перекисных радикалов НОО, образующихся эндогенно в результате окислительно-восстановительных реакций метаболизма, а также внешних факторов, в присутствии в тканях организма кислорода. Содержание АК в крови в норме у здорового человека находится в диапазоне от 7 до 14 мг/л.

Определение АК в любых объектах осложняется ее быстрым окислением в процессе пробоподготовки и анализа. Задача настоящей работы – исследование условий пробоподготовки и

анализа АК методом ВЭЖХ на сохраняемость АК в образце и вытекающие из этого открываемость, погрешность измерений и степень деградации АК.

Поскольку АК плохо удерживается в обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) [1], часть исследователей применяют ее ион-парный вариант [2-6], позволяющий добиваться хроматографического разрешения интересующего пика. Ряд исследователей пользуются электрохимическим детектором [4, 7-8] при определении АК, в качестве внутреннего стандарта для которого применяют метилмочевую [5] или изоаскорбиновую [8] кислоты, другие – спектрофотометрическим [3-4, 9-10]. Имеется также пример [11] применения масс-селективного детектора при определении витаминов. Электрохимическое детектирование упрощает анализ АК,

поскольку является селективным по отношению к ней. Описаны [12] особенности определения витаминов в изократическом режиме ВЭЖХ. В процессе пробоподготовки используются восстановители: ТСЕР - трис-(2-карбоксиэтил) фосфин [4], дитиотреитол [5, 9], DL-гомоцистеин [8], а также комплексообразователи, из которых чаще всего применяют этилендиаминтетрауксусную кислоту и ее соли (**ЭДТА**). Данных по сохранности АК в образцах крови приводится мало или они отсутствуют.

Авторами [13] описано определение АК в моче при помощи тест-полосок. АК восстанавливает фосфомолибденовую кислоту в молибденовый синий. В зависимости от содержания аскорбиновой кислоты в пробе желтая окраска зоны индикации приобретает светло-зеленый или темно-зеленый цвет. Сообщается, что чувствительность метода составляет 0.18-0.30 ммоль/л (3-5 мг/л) по АК.

Материал и методы

Исследования проводили с использованием ВЭЖХ системы Surveyor с диодно-матричным детектором PDA Plus и программным обеспечением XCalibur (Thermo, США).

Условия хроматографического разделения.

Разделения проводили на колонках Hypersil Gold C18, 150x4 мм, 5 мкм, Prism RP 150x3 мм, 3 мкм и BioBasic AX 150x3 мм, 5 мкм – производства фирмы Thermo). Скорость подвижной фазы 0.5 мл/мин, элюент состоял из смесей CH_3CN : 0.4 % HCOOH в воде, при разных соотношениях. Детектирование – УФ-сканирование 200-400 нм, температура термостата – комнатная. Объем пробы для анализа – 10 мкл. Количественные определения АК проводили на длине волны 244 нм. Идентификация пика АК осуществлялась по времени удерживания и УФ-спектру в диапазоне 200-400 нм.

Подготовка образцов. Для предотвращения потери АК в процессе пробоподготовки и анализа нами были изучены ЭДТА (в виде двунатриевой соли, $(\text{HOOC-CH}_2)_2\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{-COONa})_2$) в качестве комплексообразователя, связывающего ионы металлов, и дитиотреитол (**ДТТ**, $\text{HS-CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{-SH}$), в качестве восстановителя АК.

Образцы цельной крови подвергали депротеинизации ацетонитрилом или трихлоруксусной кислотой.

Депротеинизация. В пробирке для центрифугирования вместимостью 1.5 мл смешивали последовательно 50 мкл образца, 25 мкл 1 % раствора ЭДТА, 25 мкл раствора ДТТ (100 мг/мл) и 125 мкл осадителя протеинов. Смесь в пробирках тщательно перемешивали и центрифугировали 3 мин при 11000 мин^{-1} , после чего супернатант отделяли и анализировали. В качестве осадителя протеинов применяли по отдельности ацетонитрил и 15 % трихлоруксусную кислоту. В качестве образца использовалась консервированная кровь, не содержащая аскорбиновой кислоты.

Результаты и обсуждение

Выбор варианта ВЭЖХ. АК в варианте ОФ ВЭЖХ (Hypersil Gold C18) элюируется практически с мертвым объемом, маскируясь большим количеством сопутствующих соединений. Не удается добиться удовлетворительного разделения и при использовании колонки с более гидрофильным сорбентом (Prism-RP, 150x3 мм). Разделение АК в виде ионных пар авторы не применяли.

Удовлетворительное отделение пика АК от сопутствующих соединений достигается на колонке Thermo с сорбентом BioBasic AX, частицы силикагеля которого имеют привитую фазу полиаминного типа (...-R-NH-R-NH-R-NH-...). Удерживание обеспечивается, вероятно, за счет взаимодействия АК водородными связями с группировками N-H привитой фазы. Время удерживания АК составляет 3.30 мин при содержании 50 % CH_3CN в воде, при увеличении доли ацетонитрила до ≥ 60 % оно увеличивается, проявляя нормально-фазовый механизм разделения.

Стабилизация образцов. Количественные анализы АК невозможны без применения стабилизаторов, некоторые из них были упомянуты выше. Механизм стабилизирующего действия ЭДТА заключается в связывании им ионов тяжелых металлов (главным образом – железа), катализирующих быстрое окисление АК кислородом до дегидроаскорбиновой кислоты. Принцип же действия ДТТ заключается в обратном восстановлении дегидроаскорбиновой

Таблица 1

Определение АК в водных растворах (с добавлением ЭДТА)

Параметр	Образец				
	16 мг/л	16 мг/л (1 сутки)*	1.6 мг/л	1.6 мг/л (3 суток)*	0.16 мг/л
m (площадь пика, n = 3)	3487.3	2690.3	253.3	67.0	19.0
S_x	80.4	83.0	9.3	2.6	2.0
$\Delta(0.95)$	111.4	93.9	10.5	3.0	2.3
$\bar{\delta}_x$, %	3.2	3.5	4.2	4.5	11.9
% деградации	23		74		-

Примечания: * – после стояния указанный период времени в трее автодозатора; m – среднее значение; S_x – стандартное отклонение; $\Delta(0.95)$ – доверительный интервал; $\bar{\delta}_x$ – относительная погрешность, %.

Таблица 2

Площадь пика АК в образцах крови ($S, n=3; \pm \Delta(0.95)$)

Способ депротенинизации	CH ₃ CN		CCl ₃ COOH		-
	ЭДТА	ЭДТА + ДТТ	ЭДТА	ЭДТА + ДТТ	ЭДТА
Стабилизаторы					
Кровь + 32.8 мг/л АК	не обн.	323 ± 50	-	1350 ± 130	-
Кровь + 6.56 мг/л АК	не обн.	не обн.	36 ± 10	151 ± 14	-
Вода 1.6 мг/л АК*	-	-	-	-	253 ± 10

Примечание: * – без депротенинизации, см. табл. 1

кислоты в АК. Нами была изучена эффективность действия этих соединений по отдельности и при совместном присутствии. Результаты анализа водных растворов АК приведены в табл. 1. Здесь и далее значения площадей пиков приведены в единицах mAU·min (милли е.о.п. · мин).

Из полученных данных видно, что погрешность определения стабилизированных растворов АК в воде возрастает с понижением концентрации, что закономерно. Несмотря на стабилизацию, АК в растворах распадается в заметной степени, особенно при стоянии при комнатной температуре и на свету. При низких концентрациях (0.16 мг/л), стандартные растворы деградируют значительно быстрее, уже за 1-2 часа.

Определения АК в крови. Некоторые из результатов суммированы в табл. 2. Из данных таблицы видно, что при определениях АК в биологических объектах, пределы обнаружения гораздо выше, чем при анализе водных растворов АК, стабилизированных только ЭДТА. При этом анализы АК в крови без добавок ДТТ невозможны в диапазоне физиологических концентраций, вероятно, по причине большого количества ионов железа, катализирующих распад АК. Денатурация ацетонитрилом неэффективна даже в присутствии ДТТ, поскольку большая часть АК распадается. По сравнению с образцами, денатурированными трихлоруксусной кислотой (табл. 2), детектируемое количество АК снижается более чем в 4 раза. Стабилизирующее влияние трихлоруксусной кислоты можно объяснить формированием сильнокислой среды, в которой АК относительно устойчива. Известно, что эффективность действия ДТТ в кислой среде понижена. Несмотря на это, необходимость использования ДТТ сохраняется, в его присутствии количество регистрируемой АК увеличивается в те же 4 с лишним раза. Однако количество добавляемого ДТТ должно быть достаточно высоким и превышать содержание АК в образце минимум в 1000-5000 раз, в противном случае эффект стабилизации отсутствует. Вероятно, протекающие конкурентно реакции окисления и восстановления АК приводят к очень быстрому расходу стабилизатора, избыток которого необходим для поддержания сохранности АК на время выполнения анализа. При отборе крови на анализ из пальца количество образца не превышает 50 мкл. В такой ситуации параллельные измерения невозможны, но образца

Таблица 3

Деградация АК в образце (6.56 мг/л АК, кровь)

Параметр	Исходный образец	Через 100 мин
μ (площадь пика, $n = 3$)	150.7	110.3
S_x	12.0	11.0
$\Delta(0.95)$	13.6	12.5
$\delta_x, \%$	9.0	11.3
Деградация, %	-	27

достаточно для количественного определения АК по калибровочной зависимости, с минимально определяемым количеством (**LOQ**) около 1 мг/л. Деградация АК в подготовленных для анализа образцах крови (табл. 3.) протекает очень быстро.

Подготовленный для анализа образец теряет около трети содержания АК за 1,5 часа хранения в автодозаторе.

Заключение

Как показали проведенные исследования, успешные анализы АК в образцах крови возможны лишь при выполнении ряда условий. Депротенинизация образцов крови понижением pH среды (использование CCl₃COOH) предпочтительней других способов (депротенинизации добавлением органического модификатора- ацетонитрила), поскольку АК лучше сохраняется в сильнокислой среде. Определения АК в крови невозможны без добавления восстановителя (органических гидросульфидов-ацетилцистеина, ДТТ или аналогичных соединений). Сохранность приготовленных для анализа образцов крови очень мала, несмотря на присутствие трех стабилизирующих факторов: кислой среды, комплексообразователя и восстановителя. Образец должен анализироваться немедленно, а хроматографическое разделение нужно ускорять подбором колонки и потока элюента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Филимонов В.Н., Сирицо С.И. Параметры гидрофобности для прогнозирования удерживания водорастворимых витаминов неполярным сорбентом в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ // Изв. вузов. Серия: Химия и химическая технология. 2009. Т. 52. № 6. С. 33-35.

2. Measurement of vitamin C in blood components by high-performance liquid chromatography. Implication in assessing vitamin C status / S. Omaye et [al.] // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1987. V. 498. P. 389-401.
3. Rapid and Reliable HPLC Method for the Determination of Vitamin C in Pharmaceutical Samples / S. Mitić et [al.] // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2011. V. 10. P. 105-111.
4. Fontannaz P., Kiliç T., Heudi O. HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products // *Food Chemistry*. 2006. V. 94, № 4. P. 626–631.
5. Improved HPLC Assay for Measuring Serum Vitamin C with 1-Methyluric Acid Used as an Electrochemically Active Internal Standard / L. McCoy et [al.] // *Clinical Chemistry*. 2005. V. 51. P. 1062-1064.
6. Руденко А.О., Карцова Л.А. Определение водорастворимых витаминов группы В и витамина С в комбикормах, премиксах и биологически-активных добавках методом обращенно-фазовой ВЭЖХ // *Ж. аналит. химии*. 2010. Т. 65, № 1. С. 73-78.
7. Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrochemical Detection / Z. Gazdik et [al.] // *Sensors*. 2008. № 8. P. 7097-7112.
8. Determination of Vitamin C in Small Volumes of Blood by HPLC/EC / D. Watson et [al.] // *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004. V. 1. P. 7-10.
9. Determination of plasma vitamin C concentration in fattening cattle / L. Haiying et [al.] // *Animal Science J*. 2003. V. 74, № 1. P. 7-10.
10. ВЭЖХ-анализ водорастворимых витаминов в составе поливитаминного сиропа «Олиговит» / В.М. Староверов и [др.] // *Химико-фармацевтический журнал*. 2004. Т. 38, № 3. С. 54-56.
11. Определение водорастворимых витаминов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ с масс-селективным детектированием / А.А. Бендрышев и [др.] // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2010. Т. 76, № 8. С. 15-20.
12. Филимонов В.Н., Сирицо С.И., Макрушин Н.А. Особенности хроматографического разделения водорастворимых витаминов в изократической ОФ ВЭЖХ // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2006. Т. 6, № 2. С. 191-197.
13. Миронова И.И., Романова Л.А., Долгов В.В. *Общеклинические исследования: моча, кал, ликвор, эякулят*. Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2005. 216 с.

HPLC DETERMINATION OF ASCORBIC ACID IN BLOOD

V.V. Khasanov, K.A. Dychko, T.T. Kuriaeva, E.V. Nesterova

*Tomsk State University,
36 Lenina st., Tomsk, 634050, Russian Federation*

Sample preparation and HPLC conditions for the quantitative determination of ascorbic acid in objects with a complex matrix (blood) were studied. Influences of ascorbic acid degradation in the presence of different stabilizers and a sample matrix on the determination accuracy and sample stability were investigated. It was shown the possibility of ascorbic acid determination in blood samples, provided the mandatory acid denaturation in presence of the complexing and reducing agents. Data on stability of ascorbic acid in aqueous solutions and blood samples are provided.

Key words: Ascorbic acid, HPLC, blood samples.