

УДК 543.544:544.77

## **ПЕРВОЕ СООБЩЕНИЕ О ВОЗМОЖНОСТИ ОДНОВРЕМЕННОГО ИЗОКРАТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ВОДО- И ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ**

© 2007 Иващенко А.Л. \*, Бойченко А.П., Логинова Л.П.

В работе впервые показана возможность одновременного изократического разделения витаминов с сильно различающейся гидрофобностью (рибофлавин, никотинамид, пиридоксин, тиамин, ретинола ацетат, холекальциферол, токоферола ацетат) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением мицеллярных подвижных фаз на основе додецилсульфата натрия (ДДС) и смешанных модификаторов (1-бутанол, 1-пентанол). Впервые систематически исследовано действие смеси спиртов 1-бутанола и 1-пентанола на хроматографические характеристики разделяемых веществ. В результате достигнуто полное разделение всех изучаемых витаминов за исключением ретинола ацетата и холекальциферола. Однако многоволновое детектирование может обеспечить количественное определение и последних двух компонентов.

### **1. Введение**

Витамины являются биологическими катализаторами химических реакций или реагентами фотохимических процессов, протекающих в живой клетке. В организме человека они не синтезируются, а поступают из внешней среды [1]. Постоянная потребность организма человека и животных в витаминах привела к созданию многочисленных фармацевтических препаратов, содержащих комплексы витаминов, а также продуктов питания с их повышенным содержанием. В связи с этим возникает необходимость в контроле содержания витаминов в различных объектах.

К витаминам относят вещества разнообразной структуры, которые условно делят на две большие группы, основываясь на их растворимости: водорастворимые и жирорастворимые. Для анализа витаминов чаще всего используют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). Количество разработанных методик очень велико, и мы не будем останавливаться на их анализе в этой работе. В последние годы широкое распространение для анализа витаминов получила также мицеллярная жидкостная хроматография (МЖХ), в которой вместо токсических органических растворителей используют растворы поверхностно-активных веществ, чаще всего додецилсульфата натрия (ДДС), модифицированные небольшими добавками органических модификаторов.

В работе [2] разработана методика определения витаминов группы В<sub>6</sub> (пиридоксина, пиридоксаля и пиридоксамина) в сыворотке крови (подвижная фаза: 0.15 М ДДС, 2 % (по объему) 1-пентанола; рН 3). Практически те же условия, за исключением другого содержания 1-пентанола, составляющего 4 %, использовали авторы для разделения 5 витаминов (никотинамид, тиамин, рибофлавин, пиридоксин, пиридоксамин) [3]. Семь витаминов (аскорбиновая кислота, фолиевая кислота, цианокобаламин, рибофлавин, никотинамид, пиридоксин, тиамин) разделили в работе [4]. При оптимальных условиях (подвижная фаза: 0.016 М ДДС, 3.5 % 1-бутанола, рН 3.6; 35 °С) изократического разделения общее время хроматографирования составляло 200 мин, поэтому авторы применили градиент с увеличением содержания 1-бутанола до 10 % [4]. Время анализа при этом удалось сократить до 70 мин, что, однако, кажется недостаточным. Недавно предложена методика определения ретинола пальмитата и токоферола ацетата в мультивитаминных сиропах с мицеллярной подвижной фазой: 0.0769 М ДДС, 11.7 % 1-бутанола, рН 6.73 [5].

Интересно, что, несмотря на одно из преимуществ МЖХ – возможность одновременного разделения соединений с различной гидрофобностью, до настоящего времени не было попыток разделить смеси, содержащие одновременно водо- и жирорастворимые витамины. Насколько нам известно, в ВЭЖХ существует лишь одна работа, в которой одновременно разделены водо- и жирорастворимые витамины. Авторы применили обращено-фазовую ВЭЖХ и градиентное

\* АО «Стома», г. Харьков, ул. Ньютона, 3, 61105. Испытательная аналитическая лаборатория

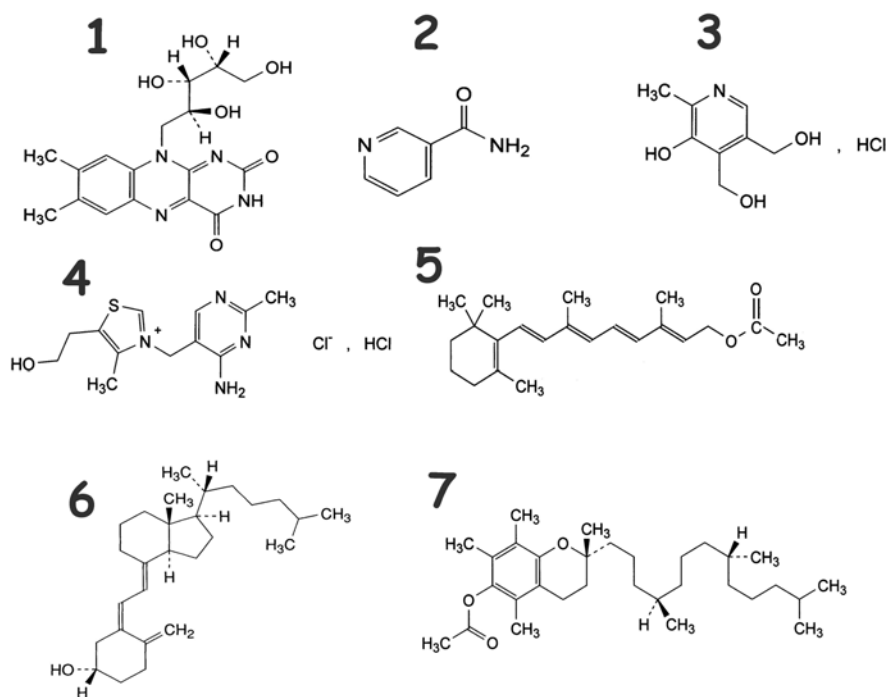
элюирование: А - 0.010 % раствор  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , pH 3.9; Б – метанол; 0-4 мин (95 % А – 5 % Б), с 4 по 10 мин линейно изменяется до (2 % А – 98 % Б), с 10 по 30 мин (2 % А – 98 % Б), с 30 по 35 мин изменяется до (95 % А - 5 % Б) [6]. Однако известно, что методики ВЭЖХ анализа лучше воспроизводятся на других колонках и оборудовании при использовании изократического (состав подвижной фазы не изменяется в ходе разделения) элюирования, кроме того, изократические разделения более удобны для практического использования в химическом анализе [7]. Это связано с i) отсутствием погрешностей при автоматическом смешивании компонентов подвижной фазы в ходе проведения анализа, когда особую важность приобретает чистота растворителей; ii) стабильностью нулевой линии, что необходимо для проведения количественного анализа; iii) более простым и дешевым хроматографическим оборудованием.

В этой работе впервые сделана попытка одновременно разделить ряд водо- и жирорастворимых витаминов в изократическом режиме методом МЖХ.

## 2. Экспериментальная часть

### 2.1 Реагенты

На рисунке 1 представлены структурные формулы исследованных в работе витаминов: 1) рибофлавин (витамин  $\text{B}_2$ ), 2) никотинамид (витамин РР); 3) пиридоксина гидрохлорид (витамин  $\text{B}_6$ ), 4) тиамина гидрохлорид (витамин  $\text{B}_1$ ), 5) ретинола ацетат (витамин  $\text{A}_1$ ), 6) холекальциферол (витамин  $\text{D}_3$ ), 7) токоферола ацетат (витамин Е). Для приготовления подвижных фаз и растворов витаминов использовали додецилсульфат натрия (ДДС) фирмы AppliChem (Германия), 1-бутанол (BuOH), 1-пентанол (PtOH) «для ВЭЖХ» Merck, спирт этиловый, ректифицированный в соответствии с ДСТУ 4224, калия дигидрофосфат (чда), ортофосфорную кислоту (осч), бидистиллированную воду.



**Рисунок 1.** Структурные формулы изучаемых витаминов [9]: 1 - рибофлавин (витамин  $\text{B}_2$ ); 2 - никотинамид (витамин РР); 3 - пиридоксина гидрохлорид (витамин  $\text{B}_6$ ); 4 - тиамина гидрохлорид (витамин  $\text{B}_1$ ); 5 - ретинола ацетат (витамин  $\text{A}_1$ ); 6 - холекальциферол (витамин  $\text{D}_3$ ); 7 - токоферола ацетат (витамин Е).

### 2.2 Аппаратура

Хроматографические эксперименты проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC 10 AVP (Shimadzu corp., Analytical instruments division, Japan, Kyoto) со спектрофотометрическим детектором (SPD-10A VP). Пробы вводили при помощи шестиходового крана, петля-

дозатор 5 мкл (Rheodyne, USA). pH-метр Seven Multy (Mettler Toledo). pH-метрическую ячейку, содержащую комбинированный электрод METTLER TOLEDO InLab 413 (Швейцария), градуировали при помощи стандартных буферных растворов с pH 1.68, 3.56, 6.86, 9.18. Ультразвуковая баня «Сапфир» (Россия) использовалась для ускорения процесса растворения витаминов.

### 2.3 Условия хроматографирования

Все разделения проводили на колонке Kromasil C18 (150 x 2.0 мм, 5 мкм, Column Engineering Inc., USA), термостатированной при 40°C. Подвижные фазы готовили в мерной колбе растворением навески ДДС в 0.02 М растворе  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , затем в раствор вводили заданное количества модификаторов (BuOH, EtOH). Их содержание выражали в единицах объемной доли. pH регулировали при помощи добавок ортофосфорной кислоты.

Изократическое разделение проводили при скорости подвижной фазы 0.2 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 5 мкл во всех экспериментах. Детектирование рибофлавина, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида, тиамин гидрохлорида и холекальциферола проводили при 270 нм, ретинола ацетата при 326 нм, токоферола ацетата при 284 нм. Перед началом хроматографирования через колонку пропускали мицеллярный элюент в течение 40 мин. Мертвое время определялось по первому отклонению от нулевой линии после ввода пробы.

Стандартный раствор рибофлавина (0.1 г/л) готовили растворением навески в 0.1 М растворе ДДС и выдерживали на ультразвуковой бане до полного растворения. Стандартные растворы пиридоксина гидрохлорида, никотинамида, тиамин гидрохлорида (0.1 г/л) готовили растворением навесок в бидистиллированной воде. Стандартные растворы ретинола ацетата, холекальциферола, токоферола ацетата (0.1 г/л) получали растворением навесок в спирте с последующим выдерживанием на ультразвуковой бане до полного растворения.

Стандартный раствор смеси водо- (рибофлавин, пиридоксина гидрохлорид, никотинамид, тиамин гидрохлорид) и жирорастворимых (ретинола ацетат, холекальциферол, токоферола ацетат) витаминов (0.1 г/л) готовили растворением навесок в этиловом спирте и выдерживали на ультразвуковой бане в течение 5 мин, после чего разбавляли 0.1 М раствором ДДС.

### 2.4 Программное обеспечение и расчет констант равновесий

Хроматограммы обрабатывались при помощи стандартной программы CLASS-VP 5.032. Для получения расчетных значений  $pK_a$  в воде и логарифмов констант распределения в системе 1-октанол-вода использовались программы ACD/pKa и ACD/Log P 4.03 (Advanced Chemistry Development, <http://www.acdlabs.com>). Другие расчеты проводились при помощи Microsoft Excel (2002, Microsoft Corporation, <http://office.microsoft.com>).

## 3. Результаты и обсуждение

### 3.1 Физико-химические свойства витаминов и априорный выбор значения pH подвижной фазы

В соответствии с химической классификацией, приведенной в монографии [1] рибофлавин относят к флавиновым витаминам, никотинамид — пиридинкарбоновым, пиридоксин — оксиметилпиридиновым, тиамин — пиримидилметилтиазолиевым, ретинола ацетат — циклогексенизопреноидным, холекальциферол — циклогексанол-этиленгидриндановым, а токоферола ацетат — хромановым витамином.

В таблице 1 приведены значения показателей констант ионизации изучаемых витаминов, а также логарифмов констант их распределения в системе 1-октанол-вода ( $\lg P_{ow}$ ). Как видно из таблицы, жирорастворимые витамины не имеют ионизируемых групп, а тиамин имеет положительный заряд на третичном атоме азота, что не позволяет рассчитать для него значение  $\lg P_{ow}$ .

Выбор значения pH подвижной фазы основан на определенных ранее закономерностях удерживания веществ различной природы при использовании подвижных фаз на основе анионного поверхностно-активного вещества — ДДС [7,10]. Удерживание сильно гидрофобных веществ, таких как жирорастворимые витамины, определяется гидрофобными взаимодействиями между веществом и мицеллами ДДС в подвижной фазе и между веществом и динамически модифицированной мономерами ПАВ стационарной фазой. При этом значение pH подвижной

фазы может лишь незначительно влиять на их удержание за счет модификации мицелл ДДС при введении в подвижную фазу буферных компонентов.

Так как одновременно с жирорастворимыми витаминами разделяются и водорастворимые витамины, то необходимо добиться условий, при которых их удержание будет максимальным. Известно, что гидрофильные вещества, имеющие отрицательный заряд практически не связываются анионными мицеллами из-за электростатического отталкивания между отрицательно заряженной поверхностью мицелл и отрицательным зарядом молекул вещества, а, следовательно, и не удерживаются динамически модифицированной стационарной фазой типа С18. С другой стороны, вещества, молекулы которых имеют положительный заряд, удерживаются достаточно сильно за счет возникающих кулоновских сил.

На основании значений  $pK_a$  приведенных в Таблице 1 можно сделать вывод, что наиболее подходящими для одновременного разделения водо- и жирорастворимых витаминов будут подвижные фазы со значением pH 3 и менее. При этом рибофлавин будет существовать в виде нейтральной молекулы, протонированной по вторичному азоту, а никотинамид, пиридоксин и тиамин будут существовать в виде катионов с протонированным атомом азота пиридиниевого цикла.

**Таблица 1.** Значения показателей констант ионизации и логарифмов констант распределения в системе 1-октанол-вода водо- и жирорастворимых витаминов

	Витамин	$pK_a$	$\lg P_{ow}$
1	рибофлавин (витамин B <sub>2</sub> );	4.4±0.4 <sup>1</sup> (NH)	-2.2±0.8 <sup>2</sup>
2	никотинамид (витамин PP);	3.35 (N <sup>+</sup> H) <sup>3</sup>	-0.37; -0.57 (pH 6.0) [8]
3	пиридоксина гидрохлорид (витамин B <sub>6</sub> );	4.85±0.03 (N <sup>+</sup> H) <sup>3</sup> 8.81±0.04 (OH) <sup>3</sup>	-1.9±0.3 <sup>2</sup>
4	тиамина гидрохлорид (витамин B <sub>1</sub> )	5.2±0.2 <sup>1</sup> (N <sup>+</sup> H)	—
5	ретинола ацетат (витамин A <sub>1</sub> );	—	7.8±0.4 <sup>2</sup>
6	холекальциферол (витамин D <sub>3</sub> ).	—	9.7±0.3 <sup>2</sup>
7	токоферола ацетат (витамин E)	—	12.0±0.3 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> расчетные значения  $pK_a$  в воде (ACD/ $pK_a$  4.03)

<sup>2</sup> расчетные значения  $\lg P_{ow}$  (ACD/Log P 4.03)

<sup>3</sup> экспериментальные значения из базы данных ACD/ $pK_a$  DB

### 3.2 Выбор органического модификатора

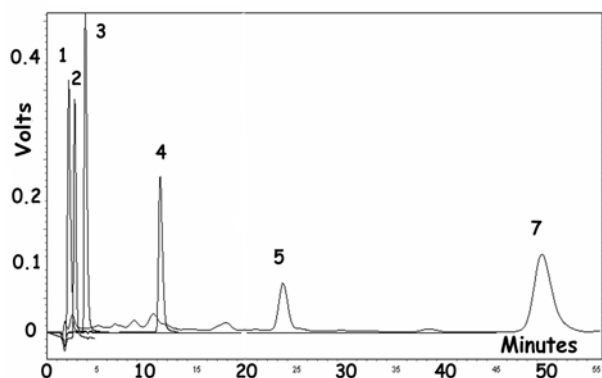
Небольшие добавки органических модификаторов, таких как алифатические спирты [12] или алифатические карбоновые кислоты [7,11], значительно увеличивают эффективность разделения в мицеллярной жидкостной хроматографии. Кроме того, они влияют на селективность разделения, что, в некоторых случаях, позволяет достигнуть более полного разделения смесей.

Для разделения полярных веществ, таких как водорастворимые витамины, чаще всего используют в качестве модификатора 1-пропанол, а для гидрофобных веществ — 1-бутанол или 1-пентанол [10]. Однако в работах, выполненных по разделению витаминов ранее [2-4], авторы выбрали 1-бутанол или 1-пентанол в качестве оптимальных модификаторов подвижных фаз на основе ДДС при определении как водорастворимых [2,3-5], так и жирорастворимых витаминов [4].

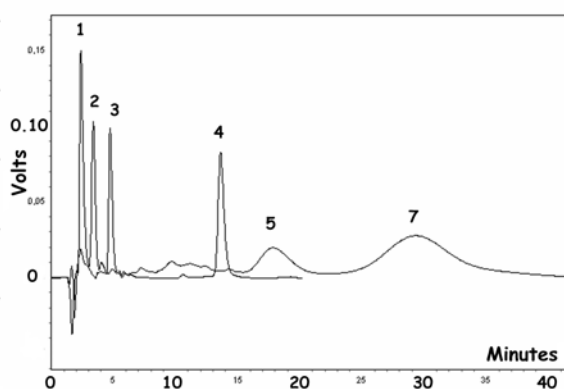
В ходе предварительных экспериментов нами исследованы подвижные фазы, содержащие 1-бутанол или 1-пентанол. При использовании подвижной фазы 0.05 М ДДС, 2 % PtOH, 0.02 М фосфатный буфер (pH 2.9) витамины А и Е не выходят из колонки, что указывает на недостаточную силу такой подвижной фазы. Подвижная фаза состава 0.077 М ДДС, 12 % BuOH, 0.02 М фосфатный буфер (pH 2.8) оказалась достаточно сильной для элюирования наиболее гидрофобных витаминов, однако время выхода витамина Е составило более 50 мин (Рис. 2). Увеличение концентрации ДДС до 0.10 М и замена 12 % BuOH на 5 % PtOH позволило снизить

время хроматографирования, но эффективность пиков при этом также значительно снизилась (Рис. 3) (под термином эффективность здесь и далее в тексте понимается число теоретических тарелок, которое для данного хроматографического пика рассчитывается как  $N = 16(t_R/w_b)$ , где  $t_R$  - время удерживания пика,  $w_b$  - ширина пика у основания).

На основании этих результатов можно предположить, что небольшими добавками 1-пентанола можно значительно изменять силу мицеллярной подвижной фазы по отношению к жирорастворимым витаминам, а добавки 1-бутанола оказывают сильное влияние на их эффективность.



**Рисунок 2.** Хроматограмма, полученная наложением хроматограмм водо- и жирорастворимых витаминов. Подвижная фаза: 0.077 М ДДС, 12 % ВиОН, 0.02 М фосфатный буфер (рН 2.8). Здесь и далее номера пиков соответствуют номерам веществ на Рис. 1 и в Табл. 1.



**Рисунок 3.** Хроматограмма, полученная наложением хроматограмм водо- и жирорастворимых витаминов. Подвижная фаза: 0.10 М ДДС, 5 % РтОН, 0.02 М фосфатный буфер (рН 2.9)

### 3.3 Исследование влияния состава смешанного модификатора, содержащего 1-бутанол и 1-пентанол, на хроматографические характеристики разделения витаминов

На основании предварительных испытаний (п. 3.2), показавших дифференцированное действие 1-бутанола и 1-пентанола на эффективность хроматографических пиков ( $N$ ) и элюирующую силу мицеллярных подвижных фаз, нами впервые систематически исследованы мицеллярные подвижные фазы, содержащие 1-бутанол и 1-пентанол в различных соотношениях. Интересно, что в работах [13,14] авторы использовали в качестве модификатора подвижных фаз на основе ДДС смесь 1-пентанола и 1-гептанола в объемном соотношении 3 : 1. Однако не дали объяснения причины выбора такого модификатора.

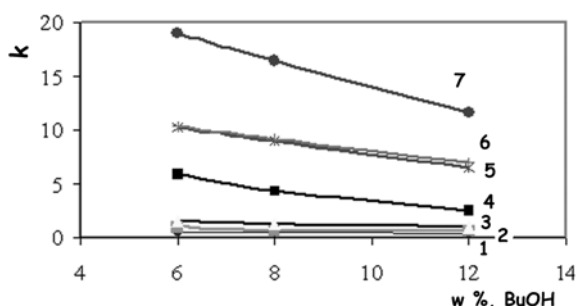
В таблице 2 представлены составы подвижных фаз исследованных нами: содержание 1-пентанола варьировали на двух уровнях — 2 и 3 %, а содержание 1-бутанола на трех уровнях — 6, 8 и 12 %. Значение рН подвижных фаз, изменявшееся в пределах от 2.47 до 2.89, влияет только на удерживание никотинамида (см. п. 3.4).

**Таблица 2.** Составы исследованных подвижных фаз

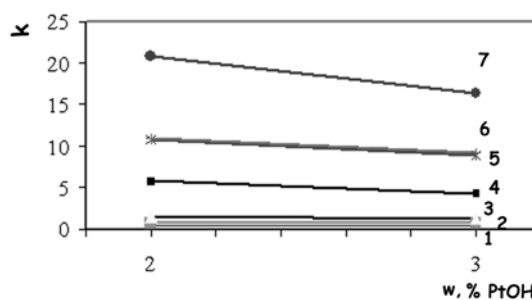
Концентрация ДДС, М	Содержание 1-бутанола, %	Содержание 1-пентанола, %	рН
0.10	6	2	2.85
	8	2	2.83
	12	2	2.89
	6	3	2.47
	8	3	2.85
	12	3	2.47
	8	2	2.47

### 3.3.1 Влияние содержания 1-бутанола и 1-пентанола на элюирующую силу мицеллярных подвижных фаз

На рисунках 4 и 5 представлены зависимости факторов удерживания 7 витаминов от содержания 1-бутанола или 1-пентанола в смешанном модификаторе. Аналогичный вид имели и зависимости, полученные при других постоянных содержаниях 1-бутанола или 1-пентанола в подвижной фазе. Увеличение содержания 1-бутанола и 1-пентанола значительно увеличивает элюирующую силу подвижных фаз по отношению к жирорастворимым витаминам — удержание токоферола ацетата, холекальциферола и ретинола ацетата уменьшается линейно с увеличением содержания 1-бутанола в подвижной фазе. Однако эффект увеличения элюирующей силы более выражен для 1-пентанола. Так, для токоферола ацетата чувствительность фактора удерживания к содержанию 1-пентанола в 1.4 раза выше, чем к содержанию 1-бутанола. На удержание водорастворимых витаминов модификаторы практически не оказывают влияния, за исключением тиамина, фактор удерживания которого уменьшается, аналогично эффекту, наблюдаемому для жирорастворимых витаминов.



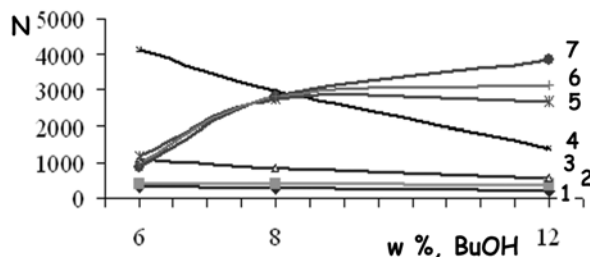
**Рисунок 4.** Зависимость фактора удерживания ( $k$ ) витаминов от объемной доли 1-бутанола в подвижной фазе при постоянном содержании 1-пентанола равном 3 %



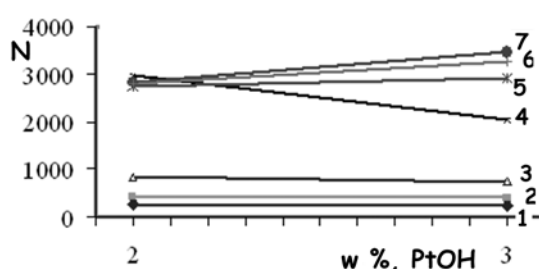
**Рисунок 5.** Зависимость фактора удерживания ( $k$ ) витаминов от объемной доли 1-пентанола в подвижной фазе при постоянном содержании 1-бутанола равном 8 %

### 3.3.2 Влияние содержания модификаторов на эффективность хроматографических пиков

Зависимости эффективности хроматографических пиков ( $N$ ) от содержания спиртов-модификаторов представлены на рисунках 6 и 7. При увеличении содержания 1-бутанола от 6 до 8 % наблюдается резкое увеличение эффективности пиков жирорастворимых ( $N$ ) витаминов (Рис. 6), которая практически не изменяется при дальнейшем увеличении содержания 1-бутанола. То, что для подвижных фаз, модифицированных 8 % 1-бутанола и 2 % 1-пентанола, достигается максимум эффективности, подтверждает и мало меняющееся число теоретических тарелок при изменении содержания 1-пентанола от 2 до 3 % при постоянном содержании 1-бутанола 8 % (Рис. 7). В то же время для аналогичной зависимости эффективности от объемной доли 1-пентанола при объемной доле 1-бутанола 6 % (не представлена на рисунке) наблюдается увеличение числа теоретических тарелок для токоферола ацетата, холекальциферола и ретинола ацетата от 800 до 2000.



**Рисунок 6.** Зависимость эффективности пиков ( $N$ ) витаминов от объемной доли 1-бутанола в подвижной фазе при постоянном содержании 1-пентанола равном 2 %



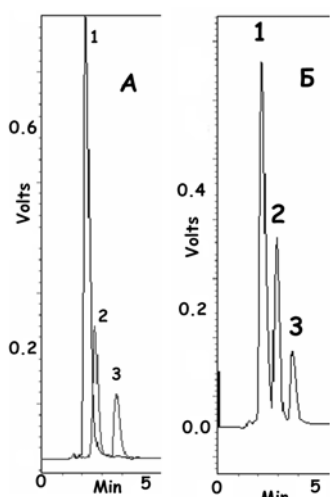
**Рисунок 7.** Зависимость эффективности пиков ( $N$ ) витаминов от объемной доли 1-пентанола в подвижной фазе при постоянном содержании 1-бутанола равном 8 %

Интересно, что тиамин снова проявляет особенное поведение. Для него эффективность резко падает при увеличении содержания 1-бутанола или 1-пентанола в мицеллярном элюенте, в отличие от других водорастворимых витаминов, для которых число теоретических тарелок остается практически неизменным. Насколько нам известно такой эффект ранее не наблюдался и требует дальнейших исследований.

### 3.4 Выбор оптимальной подвижной фазы для одновременного разделения водо- и жирорастворимых витаминов

Результаты проведенных исследований показали, что ни один состав подвижной фазы не позволяет достигнуть полного разделения ретинола ацетата и холекальциферола. Однако их одновременное количественное определение возможно при использовании многоволнового детектирования, так как максимум поглощения ретинола ацетата соответствует 326 нм, а холекальциферола 270 нм. Проблему плохого разделения трех водорастворимых витаминов (ретинола, никотинамида, пиридоксина) удалось решить за счет снижения значения pH подвижной фазы до 2.5, что повлияло на удерживание никотинамида (Рис. 8). Такой эффект хорошо согласуется с данными о кислотно-основных свойствах водорастворимых витаминов (Табл. 1).

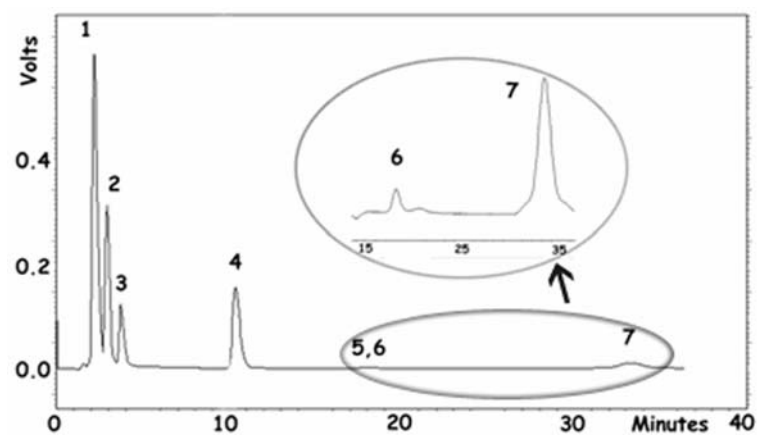
Наиболее подходящий состав подвижной фазы по соотношению времени разделения, эффективности и селективности разделения, соответствует, по нашему мнению, концентрации ДДС 0.10 М, объемным долям 1-пентанола 2 %, 1-бутанола 8 % и pH 2.47. При этом практически полностью разделяются водорастворимые витамины, и достигается максимальная эффективность для пиков жирорастворимых витаминов.



**Рисунок 8.** Разделение ретинола, никотинамида, пиридоксина при различных значениях pH подвижной фазы.

А: 0.10 ДДС, 2 % PtOH, 8 % BuOH, pH 2.83

Б: 0.10 ДДС, 2 % PtOH, 8 % BuOH, pH 2.47



**Рисунок 9.** Хроматограмма одновременного разделения водо- и жирорастворимых витаминов: 0.10 ДДС, 2 % PtOH, 8 % BuOH, pH 2.47.

## 4. Выводы

Таким образом, в этой работе впервые достигнуто одновременное разделение ряда водо- и жирорастворимых витаминов в изократическом режиме с использованием смешанных модификаторов на основе 1-бутанола и 1-пентанола. Исследовано влияние изменения содержания каждого модификатора на фактор удерживания и эффективность хроматографических пиков витаминов. Выявлено особое хроматографическое поведение тиамина гидрохлорида, для которого эффективность резко падает при увеличении содержания 1-бутанола или 1-пентанола в подвижной фазе. Полученные данные открывают новые перспективы для разработки методик одновременного определения веществ с сильно различающейся гидрофобностью.

*Авторы выражают благодарность Министерству образования и науки Украины за финансирование НИР № ГР 0104U000662 и № ГР 0107U000659 и А.Ю. Куликову за предоставленные субстанции витаминов. А.Л.И. благодарит руководство АТ «Стома» за возможность проведения экспериментальных исследований. А.П.Б. благодарит доктора А. Бертода за любезно предоставленную книгу [10].*

### Литература

1. Березовский В.М. Химия витаминов. — Москва: Пищевая промышленность, 1973.
2. Esteve-Romero J., Capella-Peiro M., Monferrer-Pons L., Gil-Agusti M. Micellar liquid chromatography in clinical chemistry: application to the monitorization of B6 vitamins // Clin. Chim. Acta — 2004. — Vol. 348. — P. 69-77.
3. Monferrer-Pons L., Capella-Peiro M.E., Gil-Agusti M., Esteve-Romero J. Micellar liquid chromatography determination of B vitamins with direct injection and ultraviolet absorbance detection // J. Chromatogr. A — 2003. — Vol. 984. — P. 223-231.
4. Ghorbani A.R., Momenbeik F., Khorasani J.H., Amini M.K. Simultaneous separation of seven water-soluble vitamins: optimization using super-modified simplex // Anal. Bioanal. Chem. — 2004. — Vol. 379. — P. 439-444.
5. Momenbeik F., Momeni Z., Khorasani J.H. Separation of vitamins E and A in multivitamin syrup using micellar liquid chromatography and simplex optimization // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2005. — Vol. 37. — P. 383-387.
6. Klejdus B., Petrlova J., Potesil D., Adam V., Mikelova R., Vacek J., Kizek R., Kuban V. Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection // Anal. Chim. Acta — 2004. — Vol. 520. — P. 57-67.
7. Boichenko A.P., Kulikov A.U., Loginova L.P., Iwashchenko A.L. Aliphatic carboxylic acids as new modifiers for separation 2,4-dinitrophenyl amino acids by micellar liquid chromatography // J. Chromatogr. A — 2007. — Vol. 1157. — P. 252-259.
8. Hansch C., Leo A.J. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. — New York: Wiley, 1979.
9. British pharmacopoeia 2005 (electronic edition, [www.pharmacopoeia.co.uk](http://www.pharmacopoeia.co.uk)).
10. Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Micellar Liquid Chromatography. — New York: Marcel Dekker, 2000.
11. Бойченко А.П., Куликов А.Ю., Логинова Л.П. Алифатические карбоновые кислоты как новые модификаторы для разделения 2,4-динитрофенильных производных аминокислот методом мицеллярной жидкостной хроматографии // Вестник Харьков. нац. ун-та. № 273. Химия. — 2006. — Вып. 14(37). — P. 101-111.
12. Dorsey J.G., DeEchegaray M.T., Landy J.S. Efficiency enhancement in micellar liquid chromatography // Anal. Chem. — 1983. — Vol. 55. — P. 924-928.
13. Rukhadze M.D., Bezarashvili G.S., Sebiskveradze M.V., Meyer V.R. Separation of barbiturates with micellar liquid chromatography and optimization by means of multifactor design // Anal. Chim. Acta — 1997. — Vol. 356. — P. 19-25.
14. Rukhadze M.D., Bezarashvili G.S., Sebiskveradze M.V., Meyer V.R. Separation of barbiturates with micellar liquid chromatography and optimization by second order mathematical design // J. Chromatogr. A — 1998. — Vol. 805. — P. 45-53.

*Поступила в редакцию 30 мая 2007 г.*

Kharkov University Bulletin. 2007. №770. Chemical Series. Issue 15(38). A.L. Iwashchenko, A.P. Boichenko, L.P. Loginova. The first communication on the opportunity of simultaneous isocratic separation of water- and fat-soluble vitamins by HPLC.

The possibility of simultaneous isocratic separation of vitamins with strongly different hydrophobicity (riboflavin, nicotinamide, pyridoxine, thiamine, retinol acetate, cholecalciferol, tocoferola acetate) by using high-performance liquid chromatography with mobile phases based on solutions of sodium dodecyl sulfate and mixed modifiers (1-butanol, 1-pentanol) has been demonstrated in this work. For the first time the systematic study of mixture of alcohols effect on chromatographic characteristics of separated substances has been provided. As a result the full separation of all investigated vitamins except retinol acetate and cholecalciferol has been achieved. However the multiwave detection can provide the quantitative determination of these two vitamins.