

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

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭРГОКАЛЬЦИФЕРОЛА В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА

Воронежский государственный университет

Обоснованы оптимальные условия определения витамина D₂ методом хроматографии и показана возможность теоретического подхода к выбору параметров хроматографического определения эргокальциферола в тонком слое сорбента.

Ключевые слова: витамин D₂; тонкослойная хроматография.

Витамины D (кальциферолы) объединяют группу родственных соединений, обладающих антирахитической активностью, важнейшие среди них — эргокальциферол (витамин D₂) (рис. 1), холекальциферол (витамин D₃) и дигидроэргокальциферол (витамин D₄) [1].

Анализ литературы за последние 10 лет показал, что при контроле качества лекарственных препаратов, содержащих витамины группы D, предпочтение отдается физико-химическим методам как наиболее экспрессным, чувствительным и информативным [2]. Более объективный качественный и количественный анализ возможно получить с помощью хроматографических методов, из которых наибольшее распространение получили тонкослойная хроматография (ТСХ) [3, 4] и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [2]. ВЭЖХ — наиболее быстрый и точный метод анализа жирорастворимых витаминов [2, 5]. Однако следует отметить, что высокая стоимость оборудования и нехватка квалифицированных кадров существенно ограничивает практическое использование метода ВЭЖХ [2]. ТСХ является важным методом разделения витаминов группы D, других жирорастворимых витаминов и стероидов, часто сопутствующих им в природных источниках и лекарственных препаратах. В последнее время стали появляться публикации, свидетельствующие о возможности количественного анализа данных ТСХ с применением специализированного оборудования и программного обеспечения [6].

В ТСХ на процесс хроматографирования влияют существенным образом растворитель, сорбент и условия анализа [7]. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение различных элюирующих систем и оптимальных условий хроматографирования, позво-

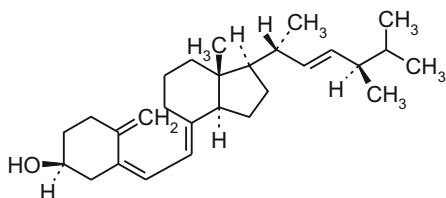


Рис. 1. Структурная формула эргокальциферола.

ляющих провести определение витамина D₂ методом ТСХ.

Экспериментальная часть

Выбор обнаруживающего реагента осуществляли с учетом таких требований как специфичность, высокая чувствительность, доступность и высокое качество получаемых хроматографических зон. Для обнаружения пятен эргокальциферола были использованы реагенты: 5 % спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты (ФМК) и 70 % раствор хлорной кислоты как наиболее часто рекомендуемые в научной литературе [3, 4]. ФМК является неспецифичным обнаруживающим реагентом и, кроме витамина D₂, обнаруживает многие другие компоненты и примеси в виде темно-синих пятен на желто-зеленом фоне. Применение кислоты хлорной в качестве детектирующего реагента нецелесообразно ввиду его высокой токсичности, а также получения размытых хроматографических зон на пластинке. Опытным путем определено, что предел обнаружения эргокальциферола с помощью ФМК по

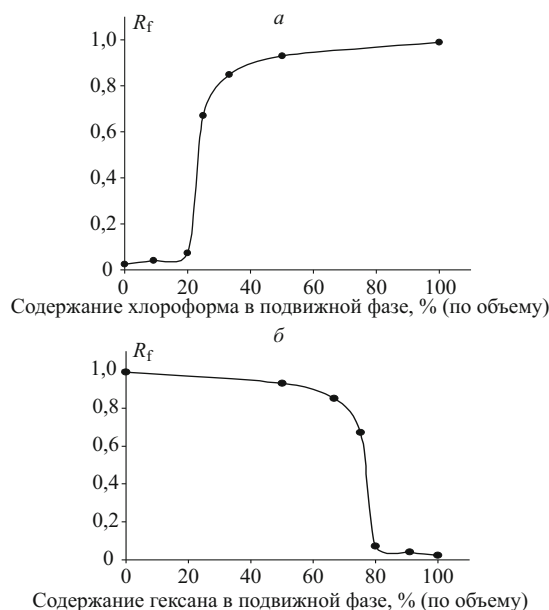


Рис. 2. Зависимость относительной скорости перемещения эргокальциферола от содержания хлороформа (а) и гексана (б) в подвижной фазе (неподвижная фаза — силикагель).



Рис. 3. Зависимость величины R_f от полярности элюирующей системы в диапазоне от 0 до 4,4.

разработанной методике ТСХ составил $7 \cdot 10^{-9}$ г, что сопоставимо по чувствительности с определением витамина D_2 методом ВЭЖХ [2].

В эксперименте изучено более 10 элюирующих систем с различными значениями полярности (табл. 1). Исследовали системы, предложенные в литературе [1 – 6], а также апробировали новые хроматографические системы.

В описанных в табл. 1 элюентах осуществляли хроматографирование стандартного раствора эргокальциферола (ФСП 42-0008018000) [8]. Пробы на пластинки наносили с помощью микрошприца объемом 1 мкл (МШ-1, Россия). Для приготовления элюентов использовали растворители марки х.ч.

На хроматограммах для каждой элюирующей системы рассчитаны такие хроматографические параметры [7], как величина (R_f); коэффициент распределения (К); полярность элюента (P). Оптимальные величины R_f , согласно [7], достигнуты в системах № 4 – 6 и 11.

Результаты и их обсуждение

При варьировании соотношением гексана и хлороформа в двухкомпонентной подвижной фазе были получены кривые зависимости величины относительной скорости перемещения вещества от процентного содержания каждого компонента в элюенте (рис. 2, а и б). Полученные зависимости позволили установить, что для достижения оптимальной величины R_f [7] содержание гексана и хлороформа в системе должно быть от 75 до 77 и от 25 до 23 % соответственно.

По полученным данным построена зависимость величины относительной подвижности (R_f) витамина D_2 (рис. 3) от полярности системы (P) в интервале от 0 до 4,4 ед. полярности.

Как видно из графика на рис. 3, при достижении величины P, равной 2,5 ед. и более, значение параметра R_f эргокальциферола перестает зависеть от полярности элюента, и определяемый компонент не сорбируется неподвижной фазой ($R_f \rightarrow 1$). При более детальном изучении влияния полярности системы на величину R_f в диапазоне от 0,5 до 1,2 ед., был выбран интервал значений P элюента, в котором данная зависимость становится линейной (от 0,58 до 1,1 ед. полярности системы) (рис. 4).

Проведена статистическая оценка параметров линейной зависимости путем расчета величины коэффициента корреляции (R^2) [9]. Установлено, что для по-

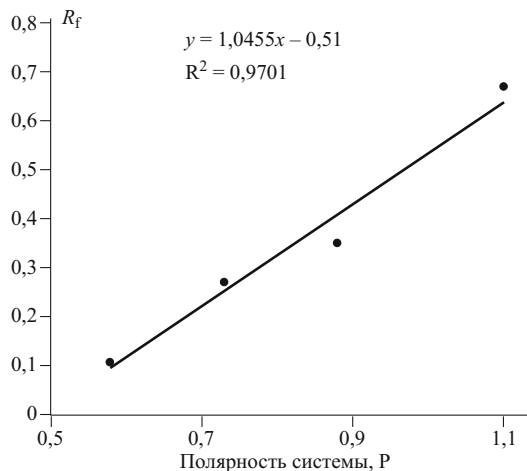


Рис. 4. Линейная зависимость величины R_f от значения полярности элюента.

лученной зависимости $|R^2| = 0,9701$. Уравнение линейной зависимости приведено на рис. 4.

С помощью предложенной зависимости можно подбирать различные системы для определения витамина D_2 в тонком слое сорбента, чтобы величина R_f укладывалась в оптимальные значения [7]. Таким образом, интервал полярности элюента может варьировать от 0,77 до 1,06 ед. [10].

В результате, по совокупности полученных данных выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия определения эргокальциферола методом хроматографии в тонком слое: сорбент — силикагелевые пластинки марки “Sorbfil” (ПТСХ-П-А, Россия) 10×10 см с полимерной подложкой; возможные элюенты – гексан – хлороформ (5:1); гексан – хлороформ (4:1); гексан – хлороформ (3:1); тетрахлорметан – диэтиловый эфир (4:1); детектирующий реагент – 5 % спиртовой раствор ФМК; оптимальный объем пробы – 0,5 мкл спиртового раствора с содержанием витамина D_2 0,035 мг/мл; время насыщения камеры парами элюента – 20 мин; время элюирования – 25 мин; время выдерживания пластинки в термостате при $t \geq 80$ °С –

Хроматографические параметры витамина D_2 в различных элюирующих системах ($n = 3$)

№ п/п	Элюент	R_f	К	P
1	Гексан — этанол (15:0,1)	$0,78 \pm 0,01$	0,36	0,034
2	Гексан	$0,025 \pm 0,002$	39	0
3	Гексан — хлороформ (10:1)	$0,04 \pm 0,002$	24	0,40
4	Гексан — хлороформ (5:1)	$0,27 \pm 0,02$	2,70	0,73
5	Гексан — хлороформ (4:1)	$0,35 \pm 0,01$	1,86	0,88
6	Гексан — хлороформ (3:1)	$0,67 \pm 0,03$	0,67	1,10
7	Гексан — хлороформ (2:1)	$0,85 \pm 0,01$	0,18	1,47
8	Гексан — хлороформ (1:1)	$0,93 \pm 0,01$	0,075	2,20
9	Гексан — диэтиловый эфир (4:1)	$0,11 \pm 0,01$	8,10	0,58
10	Октан — диэтиловый эфир (4:1)	$0,09 \pm 0,002$	10,11	0,74
11	Тetraхлорметан — диэтиловый эфир (4:1)	$0,23 \pm 0,01$	3,35	1,94
12	Хлороформ	$0,99 \pm 0,01$	0,01	4,40

5 – 7 мин; предел обнаружения эргокальциферола – $7 \cdot 10^{-9}$ г. Показана возможность теоретического подхода к выбору условий хроматографического определения витамина D₂ методом ТСХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Экспериментальная витаминология*, Ю. М. Островский (ред.), “Наука и техника”, Минск (1979), сс. 80 – 129.
2. А. И. Лутцева, Л. Г. Маслов, В. И. Середенко, *Хим.-фарм. журн.*, **35**(10), 41 – 45 (2001).
3. Ю. Кирхнер, *Тонкослойная хроматография*, Мир, Москва (1981), сс. 402 – 407.
4. М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец, *Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии*, Т. 2, Мир, Москва (1980), с. 610.
5. Ш. Герег, *Количественный анализ стероидов*, Мир, Москва (1985), сс. 330 – 380.
6. Е. В. Бородина, Т. А. Китаева, Е. Ф. Сафонова и др., *Ж. аналит. химии*, **62**(11), 1181 – 1185 (2007).
7. Ф. Гейсс, *Основы тонкослойной хроматографии*, Мир, Москва (1999).
8. “Эргокальциферол раствор в масле 0,5 %”. ФСП 42-0008018000.
9. *Государственная фармакопея*, XI изд., Вып. 1, Медицина, Москва (1987), сс. 217 – 221.
10. О. Б. Рудаков, И. А. Востров, С. В. Федоров и др., *Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии*, Изд-во “Водолей”, Воронеж (2004).

Поступила 02.11.11

OPTIMUM PARAMETERS OF ERGOCALCIFEROLE DETERMINATION IN THIN SORBENT LAYER

O. V. Trineeva, E. F. Safonova, A. I. Slivkin, and E. V. Borodina

Voronezh State University, Voronezh, 394006, Russia

Optimum conditions of vitamin D₂ determination by thin-layer chromatography (TLC) have been established. The possibility of a theoretical approach to selecting parameters of ergocalciferole determination by TLC is shown.

Key words: Vitamin D₂; thin layer chromatography.



Пресс-релиз
20 февраля 2013 года

Новая портфельная компания Биофонда РВК внесёт вклад в развитие методов терапии онкологических заболеваний

Инвестиционный комитет ООО «Биофармацевтические инвестиции РВК» («Биофонд РВК») одобрил инвестирование в компанию ООО «Андрус Рео», созданную с целью разработки и коммерциализации противоопухолевого препарата на рынке России и СНГ.

«Биофонд РВК» и компания Andrus Ltd. достигли соглашения о тесном партнерстве с публичной канадской компанией Oncolytics Biotech Inc. в разработке препарата на основе реовируса. В рамках международного проекта было создано ООО «Андрус Рео», которое планирует проведение в России части клинических исследований III фазы для дальнейшей регистрации препарата в качестве средства для лечения злокачественных опухолей головы и шеи, а также будет реализовывать программу клинических исследований III фазы по показанию «рак поджелудочной железы».

Разрабатываемый препарат представляет собой реовирус, избирательно размножающийся в клетках с активированным геном Ras, что приводит к их гибели. Установлено, что рост более 30% опухолей непосредственно вызван активацией гена Ras, а в метастазах опухоли нарушения регуляции гена Ras выявляются до 85-90% случаев. Клетки с активированным геном Ras теряют способность к выработке РНК-зависимой протеинкиназы PKR, которая блокирует размножение вируса. В результате реовирус, попадая в клетки с активированным Ras, избирательно уничтожает злокачественные клетки, сохраняя при этом окружающие ткани.

Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обращайтесь:

<http://www.oncolyticsbiotech.com/>

служба по связям с общественностью ОАО «РВК»

тел.: +7(495) 777-0104, e-mail: pr@rusventure.ru.