

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2008

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

МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВИТАМИНОВ ГРУППЫ D (ОБЗОР)

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Определение содержания витамина D — задача весьма трудная. В настоящей работе проведен контент-анализ методов определения витаминов группы D, которые нашли наиболее широкое применение и распространение в литературе. Физико-химические методы анализа в последние годы приобретают все большее значение в виду своей простоты, чувствительности и информативности. В настоящее время известно много различных способов контроля качества витаминов данной группы, однако, будущее при анализе кальциферолов несомненно принадлежит ВЭЖХ, как методу, позволяющему одновременно решать все задачи, возникающие при анализе витаминов группы D.

Название витамина D (кальциферолы) объединяет группу родственных соединений, обладающих антирахиитической активностью [1]. Важнейшие среди них — холекальциферол (витамин D₃), эргокальциферол (витамин D₂) и дигидроэргокальциферол (витамин D₄) [2]. В настоящей работе проведен обзор и анализ методов определения витаминов группы D в литературе, которые нашли наиболее широкое применение.

Биологические методы анализа. Использование биологических методов определения витамина D связано со сравнением исследуемого образца с международным стандартом. Международный стандарт витамина D распространяется ВОЗ и представляет собой раствор холекальциферола (витамина D₃) в растительном масле, содержащий в 1 мл 0,025 мкг — 1 международную единицу (1 МЕ). Биологические методы определения витамина D имеют значение при оценке лечебных и профилактических [3] доз витамина.

Однако физико-химические методы анализа в последние годы вытесняют биологические ввиду своей простоты, экспрессности, чувствительности и информативности.

Оптические методы анализа

УФ-спектрофотометрия. Роль УФ-спектрофотометрии, основанной на измерении собственного поглощения кальциферолов, в решении аналитических задач весьма скромна. Метод применим только в анализе простейших препаратов [4]; при исследовании более сложных комплексных препаратов необходимо предварительное хроматографическое разделение [5–7]. В этанольной среде витамины D₂ и D₃ образуют интенсивный максимум поглощения при 265 нм ($E_{1\text{см}}^{1\%} = 460$; $\epsilon = 18850$ для витамина D₂; $E_{1\text{см}}^{1\%} = 485$ для витамина D₃) [8]. Хотя эти цифры и служат характеристиками интенсивности спектров, простое спектрофотометрическое измерение позволяет решать только не-

сложные задачи, например изучать характеристики кристаллических субстанций или определять витамины в спиртовых растворах и в простых по составу таблетках. При анализе масляных препаратов или поливитаминов перед измерением обычно необходимо осуществлять омыление или хроматографическое разделение, поскольку определению сильно мешают витамины А и Е [9, 10]. Из-за нестойкости витамина D в растворах и водных средах, особенно при нагревании, такая операция как омыление, применяемая в ряде случаев для извлечения и определения витамина D в биологических объектах, может сопровождаться деструкцией и изомеризацией части витамина. В связи с этим в современных исследованиях для извлечения кальциферолов из биологических источников предпочитают проводить длительную экстракцию на холоду по Фолчу смесью хлороформ — метанол (1:2) [3].

Инфракрасная спектроскопия. Метод количественной инфракрасной спектроскопии, по-видимому, также пригоден для решения некоторых практических аналитических задач. Используются незначительные различия в спектрах витаминов D₂ и D₃ в интервале от 1000 до 950 см⁻¹ для их идентификации и одновременного определения. Погрешность измерения достигает ± 15 %, поэтому метод пригоден лишь для анализа искусственных смесей 2 витаминов [11]. Сообщалось [12] о количественном анализе смеси 4 компонентов (витамин D₂ и родственные соединения), основанном на различии в инфракрасных спектрах их бромдинитропроизводных в интервале 750–900 см⁻¹. Концентрации всех 4 индивидуальных компонентов были рассчитаны с помощью компьютерных программ по величине поглощения при 8 выбранных значениях волновых чисел [13]. Применение инфракрасной спектроскопии в количественном анализе осложняется очень малой чувствительностью метода [3].

Колориметрические методы. В литературе рассмотрено большое число методик фотоэлектроколори-

метрирования, основанных на образовании специфически обращенных растворов при использовании таких реагентов, как серная кислота — фурфурол [14], серная кислота — анисовый альдегид, хлорная кислота — анисовый альдегид [6], хлорная кислота — ванилин [15], трихлоруксусная кислота — фурфурол, глицерин — 1,3-дихлоргидрин [16–18], трифторуксусная кислота — пероксид водорода [6], соляная кислота — тетрахлорэтан [15, 19], реакции с пирогалловой кислотой, сахарозой, треххлористой сурьмой, солянокислым анилином, пятихлористым фосфатом, треххлористым алюминием, треххлористым йодом, хлоридами железа, ртути, олова, свинца и др. [12]. Наиболее важным из них несомненно является метод, основанный на использовании хлорида сурьмы(III). Методика основана на измерении поглощения оранжевого комплекса примерно при 500 нм; его чувствительность приблизительно в 4 раза выше чувствительности метода УФ-спектрофотометрии. С момента применения этого метода в анализе витаминов D₂ и D₃ оригинальная методика была усовершенствована. Замена первоначально предложенного хлороформа дихлорэтиленом привела к повышению устойчивости реагента, а введение ацетилхлорида в реакцию смесь ускорило развитие окраски и повысило ее устойчивость [20]. Например, в фармакопее XX США в методику определения витамина D, включающую все модификации метода с использованием хлорида сурьмы(III), введено 2 стадии разделения с помощью колоночной хроматографии витаминов. Дифференцируют витамины группы D по реакции с хлорной кислотой в среде ледяной уксусной при нагревании. Витамин D₂ при этом дает пурпурно-красную окраску, а витамин D₃ — зеле-

новато-желтую [21]. Можно измерять интенсивность зеленовато-голубой окраски, получаемой при обработке раствора витамина D в метаноле в течение 1 мин с помощью 1 % метанольного раствора анисового альдегида и серной кислоты. Хотя чувствительность этой реакции в 3–4 раза ниже чувствительности реакции с хлоридом сурьмы(III), устойчивость реагента и развивающейся окраски здесь намного выше, и поэтому такой метод пригоден для анализа масляных препаратов для инъекций (не содержащих других витаминов) после щелочного омыления и экстракции эфиром без каких-либо хроматографических разделений [22]. Хотя правильность и воспроизводимость колориметрических методов удовлетворительны, эти методы трудоемки, и поэтому их важность уменьшается в пользу других методов.

ЯМР-спектроскопия. Спектроскопия протонного магнитного резонанса также пригодна для дифференцирования и одновременного определения витаминов D₂ и D₃. Метод ЯМР-спектроскопии намного более точен, чем метод ИК-спектроскопии, основанный на использовании небольших различий в ИК-спектрах обоих витаминов [23]. Спектроскопия ЯМР ¹³C обладает большими возможностями по сравнению со спектроскопией ЯМР ¹H благодаря значительно лучшему разрешению. В работе [24] измерены спектры ЯМР ¹³C 15 % растворов D₂ и D₃ в дейтерохлороформе на спектрометре WH-90 фирмы “Брукер” (Германия). Описана возможность их надежной идентификации данным методом. Химические сдвиги (δ в м. д.) измеряли по отношению к внутреннему эталону — диоксану, δ 67,4 м. д. Наличие двойной связи между углеродными атомами C-22 и C-23 в молекуле эргокальциферола вызы-

Т а б л и ц а 1

Методы разделения витаминов D и родственных соединений с помощью колоночной хроматографии (по [12])

Разделяемые соединения	Колонка	Элюент	Способ детектирования
Витамины A и D	Целит 545 + ПЭГ 600	Изооктан	Колориметрия с хлоридом сурьмы(III)
Витамины A и D	Кизельгур + полигликоль 400	Петролейный эфир	Колориметрия с хлоридом сурьмы(III)
Витамины A и D	Оксид алюминия	Петролейный эфир — бензол (9:1)	Колориметрия с хлоридом сурьмы(III)
Витамины D ₂ и D ₃	Фактис	Ацетон — вода (19:1)	УФ + радиоизотопный
Витамины D, A и E в лекарственных препаратах	MgHPO ₄	Петролейный эфир — диэтиловый эфир (7:3)	Колориметрия с хлоридом сурьмы(III)
Препараты витамина D	Бентонит	Хлороформ	Колориметрия с хлоридом сурьмы(III)
Поливитамины в таблетках	Оксид алюминия, обработанный фосфатом	Петролейный эфир — хлороформ (4:1)	Газовая хроматография
Препараты витамина D	Оксид алюминия или кремнекислота	Хлороформ	Колориметрия с трифторуксусной кислотой
Препараты поливитаминов	Силанизированный кизельгур	90 % водный метанол	Колориметрия с хлоридом сурьмы(III)
Витамины D, A, E в пищевых продуктах и лекарственных препаратах	Сефадекс LH-20	Изооктан	Газовая хроматография
Витамины A и D	Флорекс XXS	Бензол	Колориметрия с хлоридом сурьмы(III)
Витамин D и его изомеры	Оксид алюминия	16,5 % раствор диэтилового эфира в петролейном эфире	Колориметрия с хлоридом сурьмы(III)

вает резкое, почти на 100 м. д., смещение сигналов этих углеродов в слабое поле по сравнению с сигналами соответствующих углеродов холекальциферола [24].

Масс-спектрометрия и родственные методы. Как и в случае других стероидов, масс-спектрометрия является ценным средством идентификации витаминов D. Количественное определение гидроксильированных метаболитов витамина D₃ проводили (после триметилсилилирования) с помощью капиллярной газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии [25]. Разработан масс-спектрометрический метод определения витаминов D в присутствии других жирорастворимых витаминов. Чрезвычайно высокая селективность и чувствительность этого метода могут быть использованы для решения разнообразных проблем в анализе витамина [12].

Поляриметрия. Витамины группы D — оптически активные вещества. Европейская Фармакопея [26] рекомендует использовать данный метод для определения их подлинности и степени чистоты кальциферолов в субстанциях. Для 0,8 % спиртового раствора эргокальциферола $[\alpha]_D^{20} = \text{от } +103^\circ \text{ до } +107^\circ$; а для спиртового раствора холекальциферола той же концентрации $[\alpha]_D^{20} = \text{от } +105^\circ \text{ до } +112^\circ$ (при длине кюветы 1 дм). Метод поляриметрии дает важную информацию при анализе субстанции оптически активных веществ, но не пригоден для анализа суммы изомеров

оптически активных веществ без их предварительного разделения [27].

Флуориметрия. В анализе витаминов D флуориметрия не играет столь заметной роли, как в анализе некоторых других стероидов. Витамины D определяют в растворе трихлорэтилена, используя в качестве реагента смесь уксусного ангидрида и серной кислоты. Максимумы спектров возбуждения и испускания лежат соответственно при 390 и 470 нм [28].

Электрохимические методы анализа.

Полярография. Полярографическое определение витамина D₂ основано на восстановлении сопряженной триеновой системы до диеновой на каплюющем ртутном электроде [29]. Установлено, что полярографический метод можно применять для одновременного определения витаминов A и D₂ даже в масляных препаратах [30]. Недавно для тех же целей разработали осциллополярографический метод. В этом случае масляные препараты разбавляли 1 % раствором бромида тетраэтиламмония в смеси изопропанола и диметилформамида (1:1). Потенциал полуволны в указанном фоне — 2,52 В относительно насыщенного каломельного электрода. Несмотря на то, что витамин A также восстанавливается, осциллополярографический метод позволяет проводить одновременное определение обоих витаминов [31, 32]. Методики, в основе которых лежат электрофорез и потенциометрия при анализе доступной нам литературы не обнаружены.

Т а б л и ц а 2

Разделение витаминов D и родственных соединений методом ТСХ [12]

Разделяемые соединения	Адсорбционный слой	Растворитель (элюент)	Обнаружение (реагент)
Витамины D ₂ , A и E	Оксид алюминия	Хлороформ, тетрагидрид углерода и т.п.	Хлорная кислота, серная кислота, хлорид сурьмы(III)
Витамин D ₂ в лекарственных препаратах	Силикагель	Циклогексан — диэтиловый эфир (4:1)	Серная кислота
Витамины D, A и E	Оксид алюминия	Хлороформ	Хлорид сурьмы(III)
Витамин D ₂ и D ₃ (эфирные жирных кислот)	Силикагель + AgNO ₃	Гексан — бензол (1:1) или (2:1)	Родамин G в слое
Витамин D в лекарственных препаратах	Силикагель	Циклогексан — этилацетат (3:1), циклогексан-диэтиловый эфир (1:1)	Серная кислота, хлорид сурьмы(III), хлорид сурьмы(V)
Витамин D ₃ в лекарственных препаратах	Оксид алюминия	Хлороформ	УФ
Витамины D, A и E	Силикагель, оксид алюминия	Бензол — петролейный эфир (4:1), толуол — метилэтилкетон (99:1) и др.	Хлорная кислота, серная кислота, хлорид сурьмы(V)
Витамины D, A и E	Силикагель + полиэтиленгликоль	Петролейный эфир — бензол (1:1)	УФ
Витамин D ₃ , примеси, продукты разложения	Силикагель	Хлороформ или дихлорметан	Серная кислота, хлорид сурьмы(III)
Витамины D, A и E и стероиды	Силикагель + AgNO ₃	Хлороформ — ацетон (9:1)	Флуоресцин
Витамин D ₂ и др. витамины	Силикагель	Бензол — петролейный эфир — уксусная кислота (35:65:1)	Фосфорномолибденовая кислота, KMnO ₄ — Na ₂ CO ₃
Витамины D ₂ , A и E в лекарственных препаратах	Силикагель	Циклогексан — диэтиловый эфир (4:1)	Ce(SO ₄) ₂ — NH ₃
Витамин D в препаратах поливитаминов	Силикагель	Гексан — этилацетат (4:1)	УФ
Витамин D ₂ и стероиды	Кизельгур	Циклогексан — этилацетат (199:1)	Фосфорномолибденовая кислота
Витамин D в лекарственных препаратах	Силикагель	Циклогексан — этилацетат (1:1)	УФ

Хроматографические методы анализа

Колоночная хроматография. Многие практически важные задачи в анализе витамина D можно решить только после предварительного хроматографического разделения. Важную роль в этой области всегда играла колоночная хроматография. Хотя последние достижения в тонкослойной, газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии до некоторой степени уменьшили значение классической колоночной хроматографии, она все же остается важным средством разделения и очистки витаминов D для последующего анализа (табл. 1) [12].

Тонкослойная хроматография (ТСХ). ТСХ является важным методом отделения витаминов D от других жирорастворимых витаминов и стероидов, часто сопутствующих им в природных источниках и лекарственных препаратах. Сведения о наиболее характерных методах ТСХ суммированы в табл. 2. Некоторые из рассмотренных в табл. 2 методов пригодны для отделения витаминов группы D от витамина A и стероидов.

В работе [33] приведены величины R_f для эргокальциферола, холекальциферола, витамина A и D, L- α -токоферола (соответственно 0,35; 0,42; 0,17; 0,69) (методом ТСХ на силикагеле; обработка нитратом серебра).

На других адсорбентах (табл. 3) были определены значения величины R_f при различных условиях хроматографирования витамина D₂ [34].

Для разделения кальциферолов и родственных им соединений методами ТСХ чаще всего в качестве адсорбента используют силикагель. Удобно применять готовые пластинки силуфол в системах хлороформ — метанол (96:4 или 90:10); хлороформ; циклогексан — эфир (1:1); бензол — ацетон (9:1); гексан — бензол (1:1 или 2:1); ацетон — вода (4:1). Для обнаружения пятен веществ используют, кроме вышеупомянутых реактивов, 0,5 М спиртовой раствор КОН и 1 % раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола [35]. Для выявления кальциферолов и родственных соединений или образующихся из них продуктов на тонкослойной хроматограмме последнюю опрыскивают раствором трихлористой сурьмы в уксусной кислоте или 0,2 % $KMnO_4$ в 1 % Na_2CO_3 [21]. При использовании пластинок, содержащих люминофор, или после опрыскива-

ния люминофором, кальциферолы и родственные соединения выявляются в УФ-свете в виде темно-фиолетовых пятен на светлом люминесцирующем фоне [3]. В табл. 4 приведены значения R_f для витамина D₂, представленные в работе [21].

Для того чтобы избежать процесса разложения и появления продуктов разложения на хроматограммах, а также для того чтобы избежать невоспроизводимых потерь в процессе количественных определений, авторы работ [9, 10] рекомендуют при анализе принимать следующие меры предосторожности:

- а) работать в прохладном помещении;
- б) на протяжении всего процесса хроматографирования избегать воздействия прямого солнечного света. Если зоны, которые необходимо элюировать, детектируют при УФ-облучении, продолжительность облучения должна быть минимальной;
- в) желательно проводить хроматографирование в атмосфере азота или вводить в растворитель антиоксидант (0,002 % бутилокси толуол [12]; 0,01 % сквален [21]; 0,05 % трилон Б [3]);
- г) необходимо применять растворители высокой чистоты;
- д) помещать пластинку в хроматографическую камеру сразу же после нанесения испытуемого раствора, не высушивая его, и, после разделения зон, детектировать и элюировать, не дожидаясь испарения растворителя [12].

Газовая хроматография (ГХ). Метод ГХ наряду с идентификацией и количественной оценкой содержания витамина D обеспечивает отделение от ряда сопутствующих соединений, а также делает возможным раздельное количественное определение эрго- и холекальциферола [3]. Следует отметить и сравнительно высокую чувствительность метода ГЖХ. Если учесть низкую летучесть и высокую термическую неустойчивость витаминов D, то, естественно, нельзя хроматографировать их в нативном виде. Однако применение ГХ возможно, о чем свидетельствует большое число статей, посвященных использованию газовой хроматографии для решения различных практически важ-

Таблица 3
Величины R_f витамина D₂ при различных условиях хроматографирования [35]

№ п/п	Элюент	Соотношение растворителей	Адсорбент	R_f
1	Хлороформ — этилацетат	14:4	Оксид алюминия	0,51
2	Тетрахлорид углерода — ацетон	10:1	Кизельгель Оксид алюминия	0,59 0,47
3	Бензол — ацетон	9:1	Кизельгель Оксид алюминия	0,60 0,27
4	Бензол — этилацетат	10:2,5	Оксид алюминия	0,51

Таблица 4
Величины R_f витамина D₂, полученные в различных растворителях на незакрепленных слоях оксида алюминия

№ п/п	Растворитель	R_f
1	Метанол	0,8
2	Безводный этанол	0,91
3	Бутанол	0,93
4	Бензиловый спирт	0,98
5	Гексан	0,79
6	Циклогексан	0,98
7	Петролейный эфир	0,05
8	Бензин	0
9	Толуол	0,17
10	Ксилол	0,12
11	Хлороформ	0,58
12	Тетрахлорид углерода	0,09
13	Бензол	0,24

ных аналитических задач [27, 36]. Эти работы можно разделить на 2 группы. В одной группе — витамины D вводят в газовый хроматограф без предварительной химической обработки, в другой — после перевода их в триметилсилиловые эфиры или трифторацетаты [7]. Альтернативное решение состоит в изомеризации витаминов D в растворе перед проведением газохроматографического определения [36]. В работе [12] изучено влияние реакций триметилсилилирования и трифторацетилирования на разделение витаминов D₂, D₃ и родственных соединений. В качестве внутреннего стандарта в многокомпонентных лекарственных формах при определении витамина D₂ использовали витамин D₃ [27, 36]. Широкое использование этого метода ограничивается необходимостью тщательной много-

стадийной предварительной очистки исследуемого образца от сопутствующих соединений и высокой стоимостью хроматографов, пригодных для определения кальциферолов (в частности, снабженных стеклянными колонками).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). ВЭЖХ — чрезвычайно удобный метод решения практически всех задач, возникающих в процессе количественного анализа витаминов группы D [27, 37, 38], и в будущем значение этого метода, видимо возрастет. Причина здесь в следующем: во-первых, высокая разрешающая способность ВЭЖХ позволяет разделить практически все изомеры витаминов D. Во-вторых, метод позволяет исключить стадии предварительного разделения и очистки, и/или сократить

Т а б л и ц а 5

Определение витаминов D и их метаболитов методом ВЭЖХ [12]

Разделяемые соединения	Образец	Колонка	Элюент	Замечания
Витамины D ₃ , A, E и K	Лекарственные препараты	Пермафаз ODS	Градиентное элюирование: T = 70 или 50 °C сначала водой, в конце метанолом (5 %/мин) или смесью метанол – вода (78:22)	
Витамин D ₂ ацетат витамина A	Лекарственные препараты	Зорбакс SIL	Дихлорметан — этилацетат — гептан (4:12:48)	Внутренний стандарт — 4-нитрофенилацетонитрил
Витамин D ₃	Пищевые добавки	μ-Порасил, μ-Бондапак C18	0,4 % раствор этанола в хлороформе, ацетонитрил — метанол (1:1)	Хроматография в системе с нормальными, а затем с обращенными фазами
Витамины D ₂ , D ₃ , A, E	Готовые лекарственные формы	Видак, обращенные фазы	Метанол — вода (9:1)	-
Витамины D ₂ , D ₃	Смесь стандартов	μ-Бондапак C18	2,4 г серебра нитрата в 100 мл смеси метанола и воды (86,5:13,5)	-
Витамин D ₃ и его изомеры	Масла, концентраты	Партисил 10PX5	0,9 % раствор этанола в изооктане	-
Витамин D ₂ , A, E	Таблетки	LDC RP-8	Метанол — вода (19:1)	Автоматизированная система
Витамины D ₂ , A, E	Таблетки	Микропак CH-10	2 – 20 % раствор воды в метаноле	-
Витамины D ₂ , D ₃ и их изомеры	Масла, концентраты, таблетки	μ-Порасил	Петролейный эфир — дихлорэтан — тетрагидрофуран (85:8:7) и др.	-
Витамины A и D	Рыбий жир	Лихросорб SI-60	0,375 % раствор амилового спирта в гексане	Внутренний стандарт для витамина D ₃ — витамин D ₂
Витамин D ₂ , ацетаты витаминов A и E	Таблетки	Фенил — μ-бондапак и μ-Бондапак C18	Разные градиентные программы с содержанием от 70 до 100 % метанола в воде	Внутренний стандарт — бензоат холестерина
Витамин D ₂ , A, E	Таблетки	Партисил 10	1,25 % раствор 2-пропанола в циклогексане	Внутренний стандарт 4-оксибифенил
Витамины D ₂ , D ₃	Лекарственные препараты	Лихросорб SI-60, Партисил 5	Гексан-амиловый спирт (997:3)	Колонка для очистки с RP-8, внутренний стандарт 4,6-холестадиенол
Витамины D ₂ , D ₃	Лекарственные препараты	Силикагель SI-5A	Гексан (частично насыщенный водой) — хлороформ — тетрагидрофуран — уксусная кислота (40:60:1,5:0,4)	Внутренний стандарт — прогестерон
Витамины D ₂ , D ₃ , A, E и K	Детские лекарственные средства	Зорбакс ODS	Градиентное элюирование смесью метанол — этилацетат (86:14) — ацетонитрил	Внутренний стандарт — фенилацетат холестерина
Витамины D ₂ , A, E	Таблетки поливитаминов	Партисил 10, Партисил ODS	1,25 % раствор 2-пропанола в циклогексане, метанол — вода (9:1)	Внутренний стандарт 4-оксибифенил

их продолжительность. В-третьих, условия ВЭЖХ не вызывают разрушения или перегруппировки, как это часто случается со многими из этих соединений (чувствительными к нагреванию, атмосферному кислороду и т. д.). Кроме того, практически все подлежащие определению производные имеют высокие молярные коэффициенты поглощения в УФ-области от 260 до 300 нм, что позволяет проводить их обнаружение и количественное определение вплоть до нанogramмовых количеств с помощью УФ-детектора [39 – 42]. Электрохимическая детекция иногда применяется для количественного определения витаминов D₂ и D₃ в лекарственных препаратах, в том числе поливитаминных [27]. Как следует из данных табл. 5, для разделения и определения витаминов D в различных образцах широко используются адсорбционные и распределительные системы с обращенными фазами [12]. Для количественного определения изомеров витамина D с использованием ВЭЖХ следует учитывать, что УФ-детектор обладает сильно различающейся чувствительностью относительно отдельных производных [12].

В Фармакопее США 24 издания [43] представлены 3 унифицированные методики анализа витамина в капсулах и таблетках, различающиеся главным образом методами подготовки пробы (табл. 6) [27].

С помощью ВЭЖХ также можно легко отделить витамины группы D от других жирорастворимых витаминов [27, 37, 39, 42, 44], что позволяет проводить определение производных этого витамина в лекарственных формах [45]. Витамин D можно определить в капсулах в присутствии больших количеств спиртовой формы витамина А (ретинола) и ацетата витамина А (ацетата) или ацетата и сукцината витамина Е с использованием простой экстракции без хроматографической очистки экстрактов [12].

Другие методы. Описано титрование витамина D₃ трихлоридом йода. В процессе титрования образуется гексахлорпроизводное, и конечную точку можно обнаружить фотометрически по окраске освобождающегося йода [46]. Описан количественный спектрополяриметрический метод определения витаминов D в масляных препаратах [15]. Разработано количественное микроопределение эргокальциферола в субстанции и лекарственной форме с использованием N-бромсукцинимиды.

В целом, определение содержания витамина D — задача весьма трудная. УФ-спектрофотометрия не достаточно пригодна для этой цели, поскольку примеси и продукты разложения имеют свой λ_{\max} вблизи максимума поглощения витаминов группы D (265 нм). Поэтому различные Фармакопеи, содержащие методики, основанные на измерении поглощения, не рекомендуют УФ-спектрофотометрию в качестве аналитического метода. Колориметрические методики мало пригодны для этой цели, вследствие низкой точности и слабой селективности. Предварительное разделение с помощью колоночной или тонкослойной хроматографии могло бы устранить трудности, но вместе с тем

введение хроматографических стадий создает новый источник ошибок, которые могут быть даже выше допустимых. Фармакопея VIII Японии, например, рекомендует для решения последней задачи реакцию с дигитонином (обладая структурой стероидов, провитамины осаждаются этим реагентом, а витамины D им не осаждаются) [47]. ТСХ в настоящее время служит лишь для идентификации и обнаружения примеси провитамина D [20]. Количественный вариант ТСХ предъявляет повышенные метрологические требования ко всем стадиям анализа: от нанесения пробы на пластинку и до выбора метода расчета содержания определяемого компонента. Программное обеспечение “Sorbfil Videodensitometer” предусматривает количественное определение лишь методом внешнего стандарта. ГФ XI издания не содержит методик анализа витаминов данной группы [48]. В ГФ X издания представлена фармакопейная статья только на масляный раствор эргокальциферола [20]. Электрохимические методы в настоящее время ограниченно используются в фармацевтическом анализе, по-видимому, из-за недостаточной распространенности оборудования, а также токсичности используемой в полярографах ртути [27]. Биологические методы требуют использования оснащенных помещений и лабораторных животных, а также весьма трудоемки и длительны. Метод ЯМР ¹³C является надежным способом идентификации эрго- и холекальциферола [24], однако он не встречается в нормативной документации на эти витамины, по-видимому, из-за сложного и дорогостоящего оборудования. Титриметрические методики, отличающиеся высокой точностью, но низкой избирательностью, применяются главным образом в анализе лекарственных веществ — субстанций и мало пригодны для анализа многокомпонентных лекарственных форм [27]. В настоящее время метод ВЭЖХ не получил широкого распространения в фармацевтической аптечной практике в России ввиду недоступности оборудования и дефицита квалифицированных кадров. Качественный и количественный анализ субстанций и монокомпонентных препаратов выполняется, в основном, более простыми методами: УФ- и ИК-спектроскопия, колориметрия и ТСХ [49]. Однако будущее в контроле качества кальциферолов несомненно принадлежит ВЭЖХ, как методу, позволяющему одновременно ре-

Таблица 6
Параметры методик USP 24 анализа витамина D в поливитаминных препаратах

Метод	Адсорбент	Подвижная фаза	Пробоподготовка
1	L8	Гексан — изопропанол (99:1)	Пятикратная экстракция из пробы, диспергированной в диметилсульфоксиде
2	L24	Гексан — трет-бутанол (98,75:1,25)	Однократная экстракция изоктаном из водно-диметилсульфоксидометанольной пробы
3	L1	Ацетонитрил — метанол (91:9)	Щелочной гидролиз с последующей однократной экстракцией гексаном

шать все задачи, возникающие при анализе витаминов группы D.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. А. Мелентьева, *Фармацевтическая химия некоторых природных веществ с сильным биологическим действием*, Изд-во мед. института им. И. М. Сеченова, Москва (1984), сс. 73 – 78.
2. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Москва (2002), т. 2, сс. 105 – 107.
3. Ю. М. Островский, *Экспериментальная витаминология*, “Наука и техника”, Минск (1979), сс. 18 – 53.
4. R. Strohecker and H. M. Henning, *Vitamin-Bestimmungen*, Verlag, Chemil. Weinheim (1963), pp. 264 – 290.
5. R. Adamsky and J. Sawicka, *Herba Polska*, **20**, 57 (1974).
6. H. Galecka, *Acta Pol. Pharm.*, **32**, 529 (1975).
7. T. Kobayashi and A. Adachi, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **19**, 303 (1973).
8. K. A. Tartivita, and J. P. Sciarrello, and B. C. Rudy, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1024 (1976).
9. T. Kobayashi and A. Adachi, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 41 (1976).
10. D. Sklan, P. Budowski, and M. Katz, *J. Anal. Biochem.*, **56**, 606 (1973).
11. W. W. Morris, J. B. Wilkie, S. W. Jones, et. al., *J. Anal. Chem.*, **34**, 381 (1962).
12. Ш. Герер, *Количественный анализ стероидов*, Мир, Москва (1985), сс. 330 – 380.
13. В. В. Мищенко, Г. К. Шостаковская, Н. А. Богословский и др., *Хим.-фарм. журн.*, **10**, 136 (1960).
14. T. H. Campion and S. Dilley, *Anal. Let.*, **6**, 139 (1973).
15. A. Gergely, Gy. Milch, and Vargak, et al., *Acta Pharm. Hung.*, **51**, 168 (1981).
16. F. S. Hom, S. A. Veresh, and W. R. Ebert, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **60**, 48 (1977).
17. S. A. Gharbo and L. A. Gosser, *Analyst.*, **99**, 222 (1974).
18. S. A. Gharbo and L. A. Gosser, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 1196 (1975).
19. S. M. Hassan, *J. Anal. Chem.*, **293**, 416 (1978).
20. *Государственная фармакопея СССР*, 10-е изд., Медицина, Москва (1968), с. 707.
21. Ю. Кирхнер, *Тонкослойная хроматография*, Мир, Москва (1981), сс. 402 – 407.
22. M. M. Amer, A. M. Wahbi, and S. M. Hassan, *Analyst.*, **100**, 238 (1975).
23. В. С. Карташов, В. С. Шоршнев, А. Н. Щавлинский и др., *Фармация*, № 5, 24 – 26 (1992).
24. В. С. Карташов, *Вопр. биол. мед. и фарм. химии*, № 3, 44 – 46 (1998).
25. K. Tsukida and K. Sakai, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **42**, 242 (1972).
26. *British Pharmacopea CD 2001*, V. 2, System Simulation Ltd. (2001).
27. А. И. Лутцева, Л. Г. Маслов, В. И. Середенко, *Хим.-фарм. журн.*, **35**(10), 41 – 45 (2001).
28. P. S. Chen, A. R. Terepka, and K. Lane, *J. Anal. Biochem.*, **8**, 34 (1964).
29. В. Г. Майрановский, Г. И. Самохвалов, *Электрохимия* (1965), т. 1, с. 996.
30. В. Г. Майрановский, Н. А. Богословский, Г. И. Самохвалов, *Мед. пром. СССР*, **20**, 39 (1966).
31. В. Г. Майрановский, Г. И. Самохвалов, *Ж. всес. хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева*, **9**, 358 (1964).
32. В. Г. Майрановский, Г. И. Самохвалов, *Журн. аналит. химии*, **21**, 210 (1966).
33. D. Sklan and P. Budowski, *J. Anal. Chem.*, **49**, 200 (1973).
34. R. Mermet-Bouvier, *J. Chromat.*, **59**, 226 (1973).
35. М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец, *Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии*, Мир, Москва (1980), т. 2, с. 610.
36. P. P. Nair and S. De Leor, *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 663 (1968).
37. Э. И. Козлов, И. А. Солунина, М. Л. Любарева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **37**(10), 50 – 53 (2003).
38. Г. К. Будников, Г. К. Зиятдинова, *Журн. аналит. химии*, **60**(7), 678 – 691 (2005).
39. Л. В. Денисова, В. Н. Филимонов, Л. Н. Балятинская и др., *Журн. аналит. химии*, **52**(9), 967 – 969 (1997).
40. Е. Л. Стыскин, Л. Б. Ициксон, Е. В. Брауде, *Практическая ВЭЖХ*, Химия, Москва (1986), сс. 253 – 256.
41. В. Д. Шатц, О. В. Сахартова, *ВЭЖХ: основы теории*, Зинанте, Рига (1988), с. 390.
42. А. П. Арбатский, Г. Н. Афоньшин, В. М. Востоков, *Журн. аналит. химии*, **59**(12), 1304 – 1307 (2004).
43. *United States Pharmacopoeia*, 24th Ed., Rockville (1999).
44. D. F. Tompkins and R. Tscherne, *J. Anal. Chem.*, **46**, 1602 (1974).
45. D. O. Edlund, F. A. Fillipini, and I. K. Datson, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **57**, 1089 (1974).
46. J. Green, *Biochem. J.*, **49**, 34 (1961).
47. *Pharmacopoeia of Japan VIII*, English Ed., Society of Japan Pharmacopoeia (1973), Part I, p. 153.
48. *Государственная фармакопея СССР*, 11-е изд., Медицина, Москва (1987).
49. А. И. Лутцева, Л. Г. Маслов, *Хим.-фарм. журн.*, **35**(10), 30 – 37 (2001).

Поступила 14.05.07

METHODS OF QUALITY CONTROL FOR GROUP D VITAMINS

O. V. Rybakova, E. F. Safonova, and A. I. Slivkin

Voronezh State University, Voronezh, Russia

Determination of the content of vitamin D is a rather difficult problem. In the present study, we have compared methods that are most widely used for determining group D vitamins. In recent years, physical and chemical methods of analysis find increasing use due to their simplicity, sensitivity, and informativity. Various methods of the quality control are currently used, but the future in the analysis of calciferols undoubtedly belongs to HPLC. This method is capable of simultaneously solving all problems encountered in the analysis of group D vitamins.