

НОВЫЙ ПОДХОД К ВЭЖХ-АНАЛИЗУ ЖИДКИХ ВИТАМИНСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Е.А. Белозерцева, аспирант, Е.И. Финкельштейн, профессор,
С.В. Еремин, старший преподаватель, В.И. Швец, заведующий кафедрой
кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова
e-mail: belozcat@yandex.ru

Разработана методика одностадийного количественного анализа жирорастворимых витаминов и некоторых вспомогательных веществ ряда жидких лекарственных средств на обращенной фазе в изократическом режиме.

A single-step HPLC method for the determination of fat-soluble vitamins and some additives in several liquid medicines by reverse phase in the isocratic mode was developed.

Ключевые слова: ВЭЖХ, жирорастворимые витамины, антиоксиданты.

Key words: HPLC, fat-soluble vitamins, antioxidants.

Анализ (количественный и качественный) многокомпонентных лекарственных средств, в состав которых входят соединения различной природы, обычно сопряжен с определенными трудностями. В этом отношении наиболее показательна ситуация с поливитаминными препаратами, содержащими как жиро-, так и водорастворимые компоненты. Хотя общепризнано, что высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – самый эффективный метод анализа лекарственных средств, позволяющий получать наиболее достоверные результаты [1, 2], очень часто методики анализа, предусматриваемые нормативной документацией на поликомпонентные препараты, не предполагают одновременное определение этим методом всех активных соединений [3]. При этом для ВЭЖХ-определения различных компонентов одного и того же препарата предлагается использовать не только различные элюенты, но и колонки с разными сорбентами [3, 4].

В соответствии с проектом ОФС «Количественное определение витаминов» [3] отдель-

ные группы витаминов определяются одновременно. А именно, одновременно (на одной хроматограмме) определяют жирорастворимые витамины А, D и Е; также одновременно определяют водорастворимые витамины В₁, В₂, В₅, В₆, В_С и Р. Однако для таких жирорастворимых компонентов поливитаминных препаратов, как витамин К₁ и β-каротин, предусмотрены отдельные методики. Также отдельно определяются В₃, В₁₂ и биотин. Поэтому представлялось целесообразным разработать способ ВЭЖХ-анализа поливитаминных препаратов, позволяющий одновременно определять все жирорастворимые витамины, а также изучить возможность определять наряду с этим и водорастворимые витамины (хотя бы некоторые). Цель первого этапа исследования заключалась в разработке метода одновременного определения жирорастворимых витаминов и других компонентов, входящих в состав того или иного препарата. В качестве объектов были выбраны жидкие лекарственные средства, состав которых приведен в табл. 1.

Таблица 1. Объекты анализа.

Препарат	Компоненты	
	действующие	вспомогательные (антиоксиданты)
«Аевит» (масляный раствор)	токоферолацетат, ретинопальмитат	–
«Аекол» (масляный раствор)	β-каротин, менадион, ретинолацетат, токоферолацетат	бутилокси-толуол (БОТ)
«Веторон-Е» (солубили- зированный водный раствор)	β-каротин, токоферолацетат, кислота аскорбиновая	–
«Кудесан» (солубилизи- рованный водный раствор)	убихинон Q ₁₀ , токоферолацетат	–
«Ретинола пальмитат» (масляный раствор)	ретинопальмитат	бутилоксианизол (БОА), БОТ

Согласно [3], витамины А, D и Е разделяют на колонке с сорбентом С₁₈, используя в качестве подвижной фазы (ПФ) смесь метанол–ацетонитрил (80:20). При анализе масляных растворов, так же, как и при анализе твердых

форм, предварительной стадией является омыление для перевода эфиров витаминов А и Е соответственно в ретинол и токоферол, что позволяет существенно сократить время регистрации хроматограммы по сравнению с опреде-

лением эфиров. Однако можно полагать, что такой же результат может быть достигнут и другим путем.

ПФ метанол–ацетонитрил обычно используют при разделении жирорастворимых витаминов, однако применяют также изопропанол и тетрагидрофуран [5]. При разделении каротиноидов применяют смеси метанола, ацетонитрила и дихлорметана [5]. Для выбора условий анализа перечисленных в табл. 1 препаратов изучено разделение входящих в их состав компонентов на колонках с сорбентом C_{18} в зависимости от состава ПФ. Полученные результаты позволили предложить принципиально новую ПФ для ВЭЖХ-анализа смесей жирорастворимых витаминов и других соединений.

Экспериментальная часть

Метанол (х.ч., Merck, Германия), изопропанол (о.с.ч., Panreac, Испания) и ацетонитрил (х.ч., Криохром, Россия) использовали без дополнительной очистки. Диоксан (ч.д.а., Merck, Германия) и тетрагидрофуран (ч.д.а., ISP, Германия) очищали от перекисных примесей стандартными методами [6] и перегоняли в атмосфере азота.

Стандартные образцы: ретинилпальмитат, 98% (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария); бутилоксианизол, 98.5% (Beta Pharma (Shanghai) Co. Ltd., Китай); бутилокситолуол, 99.8% (Parchem Trading Ltd., США); токоферилацетат, 96% (Roche Diagnostics GmbH, Германия); убихинон Q_{10} , 99% (Zhejiang Nhu Co. Ltd., Китай); холекальциферол, 98% (Sigma, США); менадион, 98%

(Parchem Trading Ltd., США); β -каротин, 96% (Parchem Trading Ltd., США).

Навески препаратов (табл. 1) и соответствующих стандартов растворяли в 5 мл ПФ, выдерживали на водяной бане при 35°C в течение 10 мин и охлаждали до комнатной температуры.

Анализ проводили при комнатной температуре на хроматографе высокого давления Knauer (Германия) с диодноматричным детектором GBC (Австралия), объем вводимой пробы 20 мкл. Типы использованных колонок и составы ПФ приведены в табл. 2.

Для обработки хроматограмм использовали программное обеспечение WinChrom.

Результаты и их обсуждение

Выбор условий разделения различных по свойствам компонентов проведен на примере препарата «Ретинола пальмитат». При хроматографировании масляных лекарственных форм, таких как «Ретинола пальмитат», необходимо решить проблему удаления растительного масла с колонки. С этой целью в качестве ПФ обычно используют смеси, содержащие изопропанол, который смешивается с растительными маслами [7, с. 92] и способствует эффективному удалению их с колонок. Поэтому нами в качестве ПФ были испытаны тройные смеси изопропанол–метанол–вода и изопропанол–ацетонитрил–вода. Поскольку во всех случаях пик ретинилпальмитата эффективно отделяется от пиков антиоксидантов ($R > 10$), пригодность системы характеризуется разрешением пиков антиоксидантов БОТ и БОА. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты разделения БОА и БОТ в изопропанолсодержащих ПФ.

Колонка	ПФ	Состав ПФ	Разрешение пиков БОА и БОТ (R)
Symmetry C18, 5 мкм, 150×3.9 мм,	изопропанол–метанол–вода	85:85:30	<1
		70:15:15	
		70:13:17	
		73:10:17	
		50:50:10	
	изопропанол–ацетонитрил–вода	50:50:8	
Zorbax C8, 7 мкм, 250×4.6 мм	изопропанол–метанол–вода	55:50:10	<1
		50:50:5	
		50:50:7	
		50:50:8	
Wakosil C18, 5 мкм, 150×4.6 мм	изопропанол–метанол–вода	50:50:5	<1
		50:50:8	
	изопропанол–ацетонитрил–вода	50:50:8	
		50:50:8	
		50:50:10	
		55:50:10	

Видно, что использование ПФ, содержащих изопропанол (независимо от их состава), не позволяет добиться полного разрешения пиков антиоксидантов, то есть разрешение между пиками $R < 1.5$. Добавление ион-парных реагентов не приводило к увеличению этого значения. Поэтому были использованы принципиально другие ПФ, содержащие вместо спиртов, циклические эфиры – ТГФ или диоксан. Вязкость

этих модификаторов (0.460 и 1.194 мПа·с соответственно) существенно ниже вязкости изопропанола (2.073 мПа·с) [7]. ТГФ и диоксан [7, с. 334] смешиваются с растительными маслами, то есть обеспечивают эффективную очистку колонки. Результаты разделения в системах циклический эфир–вода приведены в табл. 3 и на рис. 1а–в.

Таблица 3. Результаты разделения БОА и БОТ в системах циклический эфир–вода.

Колонка	ПФ	Скорость потока, мл/мин	Разрешение пиков БОА и БОТ (R)
Wakosil C18, 5 мкм, 150×4.6 мм	диоксан–вода (9:1)	0.5	2.5
	диоксан–вода (88:12)	0.5	3.1
Сепарон C18, 5 мкм, 100×4 мм	ТГФ–вода (7:3)	1	5.7
	диоксан–вода (88:12)	0.5	3.7

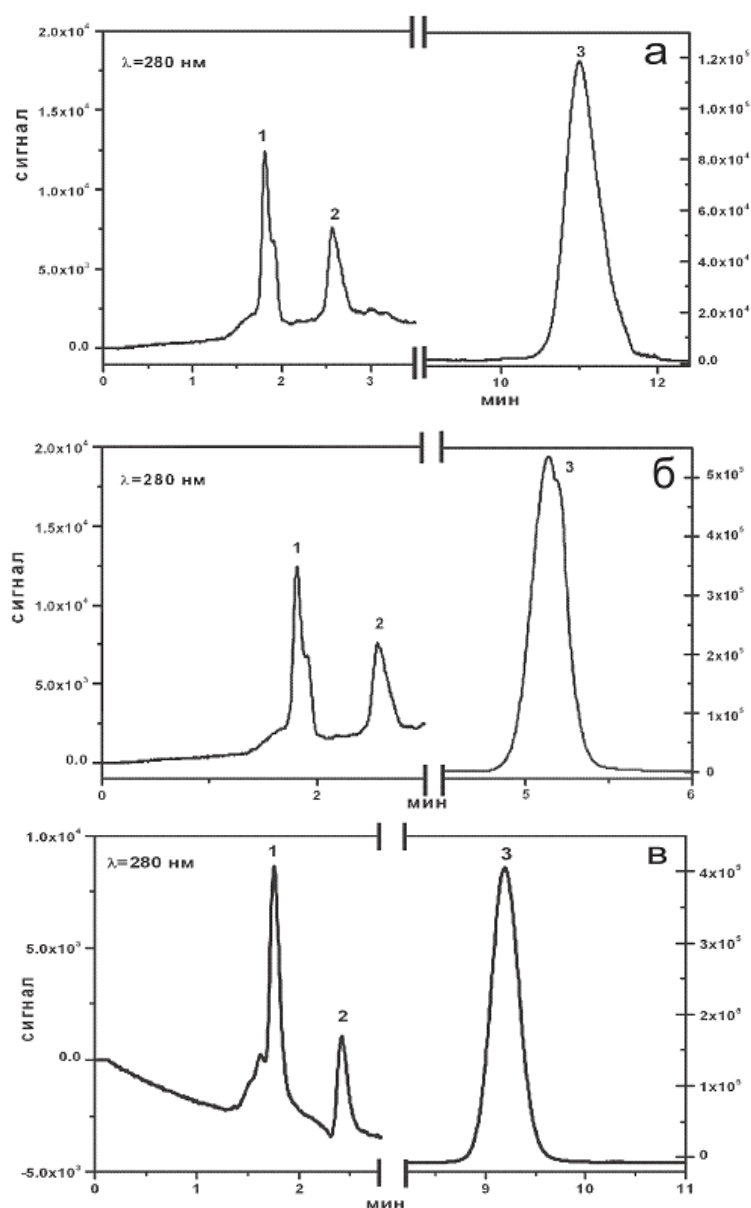


Рис. 1. Хроматограммы препарата «Ретинола пальмитат»: а – колонка Wakosil C18, 5 мкм, 150×4.6 мм, ПФ диоксан–вода (9:1), скорость потока 1.0 мл/мин; б – колонка Сепарон C18, 5 мкм, 100×4 мм, ПФ ТГФ–вода (7:3), скорость потока 0.5 мл/мин; в – колонка Сепарон C18, 5 мкм, 100×4 мм, ПФ диоксан–вода (88:12), скорость потока 0.5 мл/мин. 1 – БОА, 2 – БОТ, 3 – ретинилпальмитат.

В случае ПФ ТГФ–вода достигается эффективное разрешение пиков антиоксидантов и резко уменьшается время удерживания ретинилпальмитата, однако форма пика последнего искажена. Вероятно, это обусловлено влиянием ТГФ, так как известно, что при повышенном содержании ТГФ в ПФ может происходить искажение формы пиков определяемых соединений и даже их расщепление [7, с. 340]. Поэтому в дальнейшем в качестве модификатора был использован только диоксан.

Установлено, что наилучшее разделение всех компонентов этого препарата (разрешение пиков антиоксидантов $R = 3.72$ при времени удерживания ретинилпальмитата не более 10 мин) достигается при составе ПФ диоксан–вода 88:12 (рис. 1в).

В литературе имеются сведения, что ТГФ и диоксан обычно используют в бинарных системах растворителей для обращенно-фазных разделений [7, с. 336], однако по нашим данным, в литературе отсутствуют сведения об использовании диоксана в качестве компонента ПФ при анализе витаминов [5, 8–22].

Диоксан имеет ряд преимуществ перед ТГФ: он дешевле и значительно стабильнее. Кроме того, ТГФ легко окисляется кислородом воздуха, образуя взрывоопасные перекиси. Окисляемость ТГФ в 11.3 раза больше окисляемости диоксана. А именно, по данным [23] окисляемость для ТГФ и диоксана составляет 0.78 и 0.069 (л/моль·с)^{1/2} соответственно. При этом для октадецилсилана элюирующая сила диоксана (11.7) в 3 раза превышает элюирующую силу ТГФ (3.7) [7, с. 337].

Проведено разделение модельной смеси витаминов (менадион, ретинилацетат, холекальциферол, токоферолацетат, β -каротин, ретинилпальмитат), а также анализ препаратов «Аевит», «Аекол», «Кудесан», «Веторон-Е». Полученные хроматограммы приведены на рис. 2–4. На рис. 3б и 4б показаны спектры (УФ и видимая область) пиков, времена удерживания которых соответствует β -каротину. Пики расщеплены, спектры отвечают различным временам удерживания. Видно, что спектру β -каротина соответствуют только спектры в точках 1 и 2, у последующих другая форма, и соответствующие соединения, вероятно, представляют собой продукты деструкции β -каротина. Их наличие обусловлено, скорее всего, некорректным хранением препаратов перед поступлением на анализ.

Из рис. 2–4 видно, что пики определяемых компонентов разрешаются до базовой линии ($R \geq 1.5$). Пики симметричны на хроматограммах как анализируемых препаратов (таб. 1), так и модельной смеси ($0.8 \leq T \leq 1.5$). На примере ряда соединений, входящих в состав анализируемых препаратов, показана линейная зависимость площади пика от концентрации вещества. Найдены соответствующие уравнения регрессии (табл. 4), где C – концентрация вещества, S – площадь пика. Во всех случаях коэффициент корреляции не хуже 0.9998. Результаты определения действующих веществ и вспомогательных компонентов приведены в табл. 5. Видно, что найденные величины укладываются в диапазон декларируемых значений содержания компонентов.

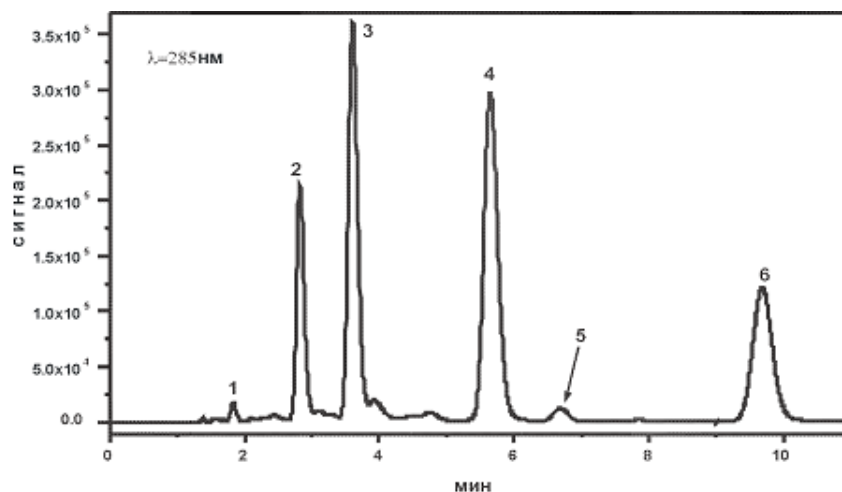


Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси жирорастворимых витаминов. Колонка Сепарон С18, 5 мкм, 100×4 мм, ПФ диоксан–вода (88:12), скорость потока 0.5 мл/мин. 1 – менадион, 2 – ретинола ацетат, 3 – холекальциферол, 4 – токоферола ацетат, 5 – β -каротин, 6 – ретинола пальмитат.

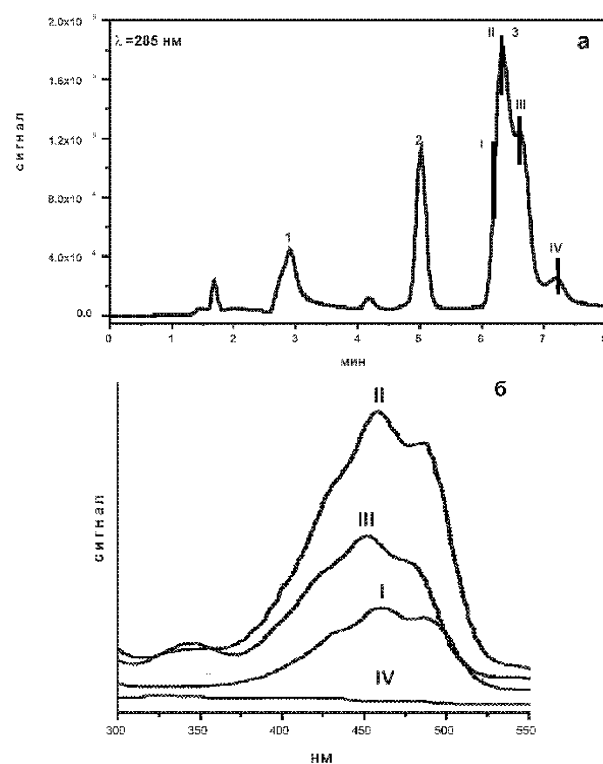


Рис. 3. а) Хроматограмма препарата «Веторон-Е». Колонка Сепарон С18, 5 мкм, 100×4 мм, ПФ диоксан–вода (88:12), скорость потока 0.5 мл/мин. 1 – аскорбиновая кислота, 2 – токоферола ацетат, 3 – β -каротин; б) спектры в точках, обозначенных на хроматограмме (для наглядности смещены по оси ординат).

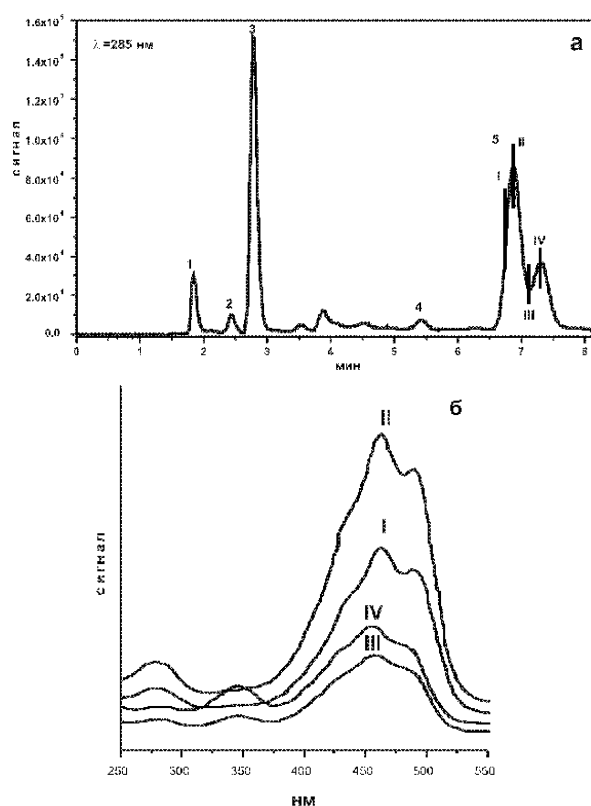


Рис. 4. а) Хроматограмма препарата «Аекол». Колонка Сепарон С18, 5 мкм, 100×4 мм, ПФ диоксан–вода (88:12), скорость потока 0.5 мл/мин. 1 – менадион, 2 – БОТ, 3 – ретинола ацетат, 4 – токоферола ацетат, 5 – β -каротин; б) спектры в точках, обозначенных на хроматограмм (для наглядности смещены по оси ординат).

Таблица 4. Основные характеристики определения ($n = 3$; $P = 0.95$).

Вещество	Диапазон линейности, мг/мл	Уравнение регрессии
Бутилоксианизол	0–0.0074	$S=(1.52 \times 10^7 \pm 2.42 \times 10^5) \times C$
Бутилокситолуол	0–0.0076	$S=(7.34 \times 10^6 \pm 5.4 \times 10^4) \times C$
Менадион	0–0.0124	$S=(2.06 \times 10^7 \pm 9 \times 10^3) \times C$
Токоферилацетат	0–0.1081	$S=(1.02 \times 10^7 \pm 2.8 \times 10^4) \times C$
Ретинилпальмитат	0–0.251	$S=(2.64 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^5) \times C$
Убихинон Q ₁₀	0–0.677	$S=(2.70 \times 10^7 \pm 9.9 \times 10^4) \times C$
Холекальциферол	0–0.047	$S=(5.20 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^5) \times C$

Таблица 5. Результаты анализа препаратов.

Образец	Компонент	Декларируемое содержание	Найдено
«Аевит»	токоферилацетат	0.090–0.110 мг/капс.	0.1 мг/капс.
	ретинилпальмитат	0.047–0.063 мг/капс.	0.056 мг/капс.
«Аекол»	бутилокситолуол	≤0.2 мг/мл	0.25 мг/мл
	менадион	0.4–0.6 мг/мл	0.57 мг/мл
	токоферилацетат	1.6–2.0 мг/мл	1.68 мг/мл
«Веторон-Е»	токоферилацетат	40±15% мг/мл	35 мг/мл
«Кудесан»	убихинон Q ₁₀	30±15% мг/мл	31 мг/мл
	токоферилацетат	4.5±15% мг/мл	4.6 мг/мл
«Ретинола пальмитат»	бутилоксианизол	0.1–1.1 мг/мл	0.096 мг/мл
	бутилокситолуол	0.1–1.1 мг/мл	0.092 мг/мл
	ретинилпальмитат	49.6–60.5 мг/мл	56.2 мг/мл

Разработанная методика одностадийного ВЭЖХ-анализа, согласно результатам статистической обработки полученных данных, соответствует требованиям, предъявляемым к фармакопейным методикам количественного анализа. На основе методики разрабатывается проект дополнений к общей фармакопейной статье

«Количественное определение витаминов» для включения в Государственную Фармакопею РФ XII издания.

Работа выполнена при финансовой поддержке и в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры России» на 2009–2013 гг. (госконтракт № 14.740.11.0120).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kazakevich Y., LoBrutto R. HPLC for pharmaceutical scientists. – New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken. 2007. 1108 p.
2. Daharwal S.J., Garg G., Saudagar R. B., Saraf S. Methods of estimation of multi-component formulations: A review // Pharm. Rev. 2006. V. 4. № 3. On-line: <http://www.pharmainfo.net/reviews/methods-estimation-multi-component-formulations-review>.
3. Финкельштейн Е.И., Рудакова И.П., Самылина И.А. Методы количественного определения витаминов в лекарственных формах // Фармация. 2007. № 4. С. 45–48.
4. Фармакопея США: USP 29: Национальный формуляр: NF 24: сборник стандартов. В 2-х т. + CD, 978-5-9704-1187-2. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.
5. De Leenheer A.P., Lambert W.P., van Bocxlaer J.F. Modern chromatographic analysis of vitamins. – New York: Marcel Dekker Inc, 2000. 606 p.
6. Вайсбергер А., Проскауэр Э., Риддик Дж, Тупс Э. Органические растворители. Физические свойства и методы очистки. – М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1958. 500 с.
7. Садек П. Растворители для ВЭЖХ. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2006. 704 с.
8. Nollet Leo M.L. Food analysis by HPLC. – New York: Marsel Dekker, Inc., 2000. 1049 p.
9. Andreoli R., Careri M., Manini R., Mori G., Musci M. HPLC analysis of fat-soluble vitamins on standard and narrow bore columns with UV, electrochemical and particle beam MS detection // Chromatogr. 1997. V. 44. № 11/12. P. 605–612.
10. Browne R.W., Armstrong D. Simultaneous determination of serum retinol, tocopherols, and carotenoids by HPLC // Methods in Mol. Biol. 1998. V. 108. P. 269–275.
11. Wang L.-H., Huang S.-H. Determination of vitamins A, D, E, and K in human and bovine serum, and β -carotene and vitamin A palmitate in cosmetic and pharmaceutical products, by isocratic HPLC // Chromatogr. 2002. V. 55. № 5/6. P. 289–296.
12. Wielinski S., Olszanowski A. Simultaneous determination of retinol acetate, retinol palmitate,

cholecalciferol, tocopherol acetate and alphacalcidol in capsules by non-aqueous reversed-phase HPLC and column backflushing // *Chromatogr.* 1999. V. 50. № 1/2. P. 109–112.

13. Ohrnacht R., Boros B., Kiss I., Jelinek L. Quick and sensitive HPLC separations on non-porous reversed-phase packings // *Chromatogr.* 1999. V. 50. № 1/2. P. 75–81.

14. Zenkevich I.G., Kosman V.M., Makarov V.G., and Dadali Yu.V. Quantitative refractometric-spectrophotometric analysis of oil solutions of vitamins A and E // *Russian J. Appl. Chem.* 2001. V. 74. № 6. P. 1034–1035.

15. Gavrilov A.S., Ivakin A.F., Zyryanov V.V., Petrov A.Yu. A refined oil-multivitamin preparation // *Pharmaceut. Chem. J.* 2002. V. 36. № 9. P. 512–514.

16. Sary E., Cruz A.M., Donomai C.A., Monfardini J.L., Vargas J.T.F. Determination of vitamins A-palmitate, A-acetate, E-acetate, D₃ and K₁ in vitamin mix by isocratic reverse phase HPLC // *J. High Resolut. Chromatogr.* 1989. V. 12. № 6. P. 421–423.

17. Moreno P., Salvado V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 870. № 1. P. 207–215.

18. Zhao B., Tham S.-Y., Lu J., Lai M.H., Lee L.K.H., Moolchala S.M. Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection // *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2004. V. 7. № 2. P. 200–204.

19. Hanachi P. Using HPLC to determination the composition and antioxidant activity of *Berberis vulgaris* // *Europ. J. Scient. Res.* 2009. V. 29. № 1. P. 47–54.

20. Gazdik Zb., Zitka O., Petrlova J., Adam V., Zehnalek J., Horna A., Reznicek V., Beklova M., Kizek R. Determination of vitamin C (ascorbic acid) using high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection // *Sensors.* 2008. V. 8. № 11. P. 7097–7112.

21. Rudenko A.O., Kartsova L.A. Determination of water-soluble vitamin B and vitamin C in combined feed, premixes, and biologically active supplements by reversed phase HPLC // *J. Analyt. Chem.* 2010. V. 65. № 1. P. 71–76.

22. Staroverov V.M., Deineka V.I., Grigor'ev A.M., Prokhoda E.F., Pokrovskii M.V., Ivanov V.V. HPLC analysis of water-soluble vitamins in the multivitamin syrup oligovit // *Pharmaceut. Chem. J.* 2004. V. 38. № 3. P. 172–174.

23. Howard J.A., Ingold K.U. Absolute rate constants for hydrocarbon autooxidation. XVII. The oxidation of some cyclic ethers // *Can. J. Chem.* 1969. V. 47. № 20. P. 3809–3815.