

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ВИТАМИНА Е (ОБЗОР)

О. В. Тринеева

Воронежский государственный университет.

Поступила в редакцию 17.05.2012 г.

Аннотация. Определение содержания витамина Е – актуальная задача фармации и нутрицевтики. В настоящей работе проведена систематизация и анализ методов определения токоферолов, которые нашли наиболее широкое применение и описаны 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 токоферолов несомненно принадлежит ВЭЖХ, как методу, позволяющему одновременно решать все задачи, возникающие при анализе витаминов группы Е.

Ключевые слова: витамин Е, контроль качества, ВЭЖХ.

Abstract. Definition of the maintenance of vitamin E - actual problem of pharmacy and nutrition. In the present work the systematization and analysis of methods of definition of tocopherols, which the widest application and described in the literature have found is lead. Physical and chemical methods of the analysis last years get the increasing value in a kind of the simplicity and sensitivity. Now various ways of quality assurance of vitamins of the given group are known many, however, the future at the analysis of tocopherols undoubtedly belongs HPLC, as to a method allowing simultaneously to solve all of a problem, arising at the analysis of vitamins of group E.

Keywords: vitamin E, quality assurance, HPLC.

Группа веществ, объединяемых общим названием «Витамин Е» включает несколько соединений — производных хромана, являющихся природными антиоксидантами, которые предотвращают окисление ненасыщенных липидов, предохраняют от разрушения клеточные мембраны и вследствие этого широко применяются для профилактики и лечения ряда заболеваний [1]. К настоящему времени выделены из природных источников или получены синтетически восемь различных веществ, обладающих Е-витаминной активностью. На рис. 1 представлена общая структурная формула токоферолов. Кроме токоферолов, к группе витаминов Е относятся обнаруженные в некоторых природных источниках и часто сопутствующие токоферолам – токотриенолы (рис. 2). α -, β -, γ -, ζ -, δ -, ε - и η -токотриенолы – аналоги соответствующих токоферолов и отличаются от них структурой боковой полиизопреноидной цепи [2,3].

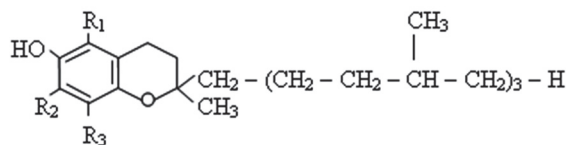


Рис. 1. Структурная формула токоферолов.

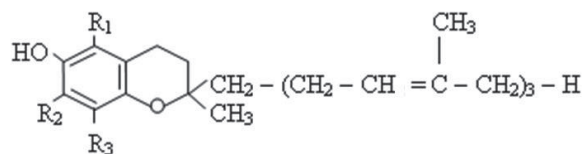


Рис. 2. Структурная формула токотриенолов [2].

При существующем многообразии препаратов витамина Е (как индивидуальных, так и комбинированных) отечественного и зарубежного производства, в нормативной документации (НД) на каждый препарат излагается собственная методика анализа. Часто методики для однотипных препаратов принципиально различаются. В настоящей работе проведено обобщение, систематизация и анализ методов определения токоферолов, которые нашли широкое практическое применение и наиболее часто описаны в научной литературе.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Биологическая активность оценивается по способности предотвращать (профилактические методы) или излечивать (лечебные методы) специфические проявления недостаточности витамина Е у животных, находящихся на рационе, лишенном этого витамина. Недостаток биологических методов определения витамина Е заключается в их трудоемкости, малой производительности, невысокой точности и невозможности определить химическую природу веществ, ответственных за эту активность. С другой стороны, эти методы позволяют выявить наличие у того или иного соединения Е-витаминной активности [4].

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Титриметрические методики в большинстве своем основаны на способности токоферолов легко окисляться с образованием хиноидных структур [5]. Реакция с хлорным золотом является количественной и экспрессной. Применяют водный или водно-спиртовой раствор хлорида золота [6,7]. Этот метод не может быть использован для определения различных изомеров токоферола, но применим для установления их суммарного количества [6]. Следует отметить, что данный реактив является труднодоступным и дорогостоящим.

Государственная фармакопея (ГФ) X издания для количественного определения токоферолов рекомендует использовать цериметрию в присутствии индикатора – дифениламина [8]. Европейская фармакопея (ЕФ) и ГФ XII издания метод цериметрического титрования предлагает для определения примеси свободного α -токоферола в α -токоферола ацетате [9-12].

Титриметрические методики, отличающиеся высокой точностью, но низкой избирательностью [5], применяются главным образом в анализе лекарственных субстанций и малоприспособны для анализа многокомпонентных лекарственных форм, содержащих близкие по свойствам соединения (группа изомеров токоферолов). Несомненно, титриметрические методики для контроля качества жирорастворимых витаминов ушли в про-

шлое. Однако в отечественной литературе последних лет можно встретить примеры использования цериметрии для количественного определения витамина Е [13].

Анализ литературных источников за последние 15 лет показал, что предпочтение отдается физико-химическим методам для контроля качества токоферолов, как наиболее экспрессным, чувствительным и информативным.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Электролитическое окисление является основой полярографического определения хроманов. Этот метод имеет ограниченное применение для природных масел, но дает прекрасные результаты для α -токоферола. β - и γ -токоферолы не дают полярографической полуволны [7,14-20].

Метод дифференциальной вольтамперометрии (ДВА) основан на способности витамина Е электрохимически окисляться на углеродных электродах различных типов, таких как стеклоуглеродный (СУ) электрод [14,15].

В работах [16-18] предложена методика кулонометрического определения витамина Е в сыворотке крови человека. Установлено, что взаимодействие α -токоферола с электрогенерированным бромом протекает быстро и количественно в соотношении 1:2 (рис. 3).

Для определения суммы токоферолов предложен метод амперометрического титрования в среде 1 н. серной кислоты раствором сульфата церия (IV) с использованием платинового электрода [7,19]. Потенциометрическое и амперометрическое титрование хлорным золотом находит ограниченное применение из-за малой специфичности, так как

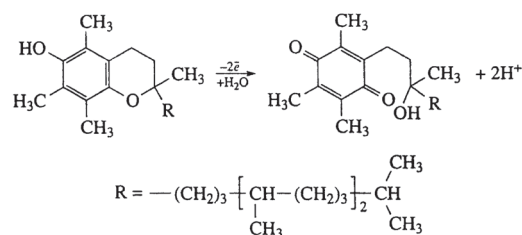


Рис. 3. Схемавзаимодействия α -токоферола с электрогенерированным бромом при кулонометрическом титровании.

хлорное золото не обладает способностью окислять эфиры токоферолов и другие производные [7].

Полярографическое определение витамина Е возможно и в виде его окисленной формы – токоферилхинона [7].

Электрохимические методы в настоящее время ограничено используются в фармацевтическом анализе, по-видимому, из-за проблем, возникающих при анализе многокомпонентных поливитаминных препаратов, сложности автоматизации анализа, а также токсичности больших количеств ртути, используемой в полярографах [5,7]. Методики анализа, в основе которых лежит электрофорез, в научной литературе не обнаружены.

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Оптические методы позволяют проводить идентификацию и количественное определение витаминов в биологических объектах, как правило, только после их предварительного отделения от других компонентов, что увеличивает время и ошибку анализа. Несмотря на это, имеется много данных об их использовании в контроле качества токоферолов [7].

Ведущими зарубежными государственными фармакопеями метод прямой спектрофотометрии рекомендован для оценки подлинности и количественного определения витамина Е в субстанции в УФ-области [9-11]. В работах отечественных ученых также можно встретить информацию об использовании данного метода. УФ-спектр 0,01 % α -токоферилацетата в 96 % этаноле в области 230 – 350 нм должен иметь максимумы поглощения при 278 ± 2 и 284 ± 2 нм ($E_{1\text{см}}^{1\%} = 42-45$) и минимум поглощения при 254 ± 2 нм ($E_{1\text{см}}^{1\%} = 7-9$) [12]. Для определения содержания D, L- α -токоферола и его чистоты снимают спектр поглощения его спиртового раствора в пределах 260 – 310 нм. На рис. 4 приведен спектр поглощения спиртового раствора D, L- α -токоферола фирмы Sigma (Германия, степень чистоты 97 %), который дает симметричный пик с максимумом поглощения при 292 ± 2 нм ($E_{1\text{см}}^{1\%} = 72-76$) и минимумом при 255 ± 2 нм ($E_{1\text{см}}^{1\%} = 6-8$) [9-11,21].

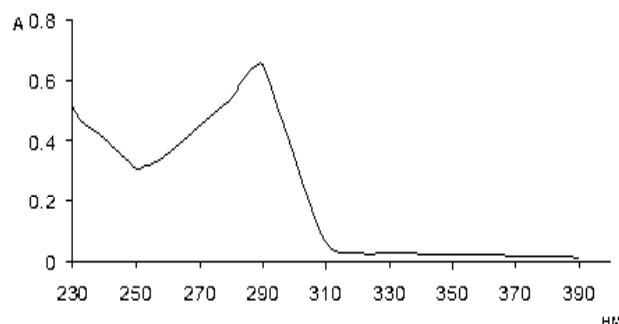


Рис. 4. Спектр поглощения спиртового раствора α -токоферола фирмы Sigma (Германия, степень чистоты 97 %).

Подлинность также подтверждают с помощью ИК-спектроскопии в области средних частот $4000 - 400 \text{ см}^{-1}$ [9-12,21]. На рис. 5 и 6 приведены спектры индивидуальных α -токоферола и α -токоферола ацетат [12]. В ИК-спектре α -токоферола ацетата (рис. 6) отсутствует полоса поглощения в области частот $3750-3200 \text{ см}^{-1}$, характерная для α -токоферола (рис. 5), обусловленная валентными колебаниями фенольного гидроксила.

Спектрофотометрия в видимой области основана на способности токоферолов окисляться с образованием окрашенных продуктов, химическая структура и окраска которых разнообразна и зависит от характера окислителя [7]. Наиболее известным из колориметрических методов анализа витамина Е, нашедшим большое практическое применение в аналитической практике, является метод Эммери-Энгеля [4,5,7,21-26]. Используя в качестве индикатора α , α' -дипиридил, фотометрически измеряют интенсивность окраски образовавшегося красного комплекса двухвалентного иона железа и α , α' -дипиридила или о-фенантролина при длине волны 520 нм [25,27]. По методу IUPAC [4] реакцию проводят при концентрации дипиридила и хлорного железа 0,01 %, по ГОСТ [25] – при концентрации хлорного железа 0,042 %, дипиридила или фенантролина – 0,02 %. Указанный способ является одним из наиболее чувствительных, доступных и позволяет отличать различные токоферолы (но не смеси их), так как последние вступают в реакцию с различными скоростями ($\alpha > \beta > \gamma > \delta$) в зависимости от температуры [4]. Воспроизводимость резуль-

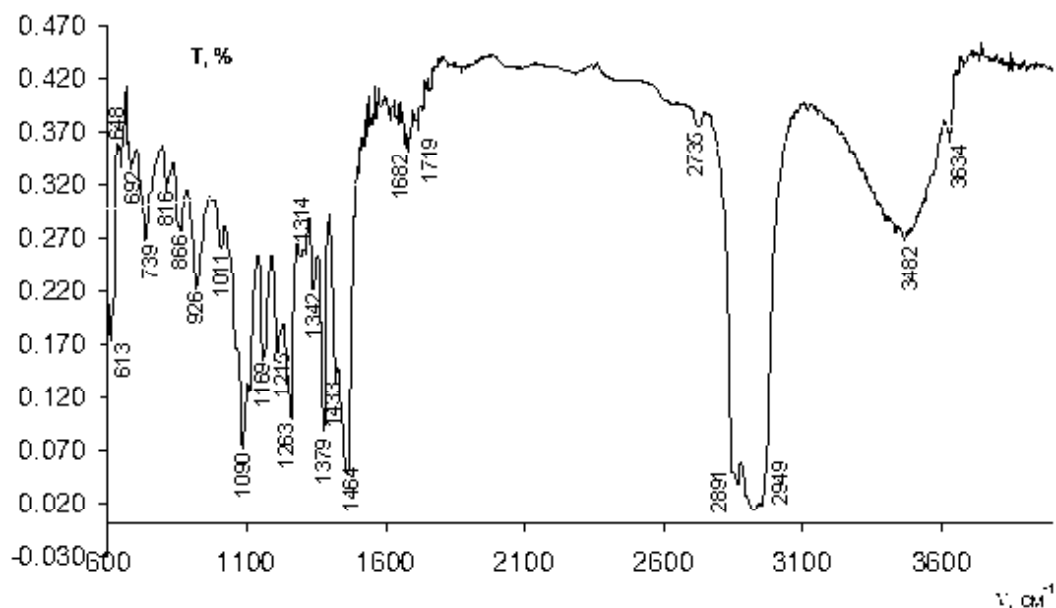


Рис. 5. ИК-спектр α -токоферола фирмы Sigma (Германия, степень чистоты 97 %).

татов 95 – 98 %. Вместо α , α' -дипиридила ГФ XI рекомендует использовать о-фенантролин, что повышает чувствительность метода более чем вдвое [22]. Некоторым недостатком этого метода является высокий и нестабильный фон окраски, обусловленный окрашиванием самого хлорного железа, а также самопроизвольным восстановлением Fe^{3+} в Fe^{2+} при действии света. Реакция с хлорным железом неспецифична для токоферолов, такую же реакцию дают все вещества, способные восстанавливать трехвалентное железо в двухвалентное. Поэтому обязательное условие при анализе биологических образцов – предварительная очистка и удаление веществ, мешающих определению (например, каротиноидов). В противном случае концентрация токоферолов завышается на 12 – 14 %. Данный метод используется для количественного определения суммы токоферолов в масле амаранта и

масляном экстракте из проростков пшеницы [23,24]. Хлорное железо окисляет только свободные токоферолы, но не их эфиры, поэтому для определения последних по реакции Эммери – Энгеля необходимо их предварительное омыление [4].

Окисление витамина Е концентрированной азотной кислотой при нагревании приводит к образованию окрашенных в красно-оранжевый цвет о-токоферилхинонов [8,13,21,27], что служит основой для количественного фотокolorиметрического определения при $\lambda=470$ нм по методу Фуртера-Мейера с использованием стандартного образца [7].

Определение витамина Е в готовых лекарственных формах также проводят спектрофотометрически при $\lambda=450$ нм после его окисления комплексом меди (II) с неocupроином [19].

γ - и δ -Токоферолы вступают в реакцию сочетания с солями диазония, образуя окрашенные азокрасители [28]. Интенсивность возникающей окраски пропорциональна концентрации токоферолов и может служить для определения количеств γ - и δ -токоферолов в смесях [4,7,28].

Данные методики фотоэлектроколориметрического количественного определения токоферолов не обладают достаточной специфичностью, требуют предварительного вы-

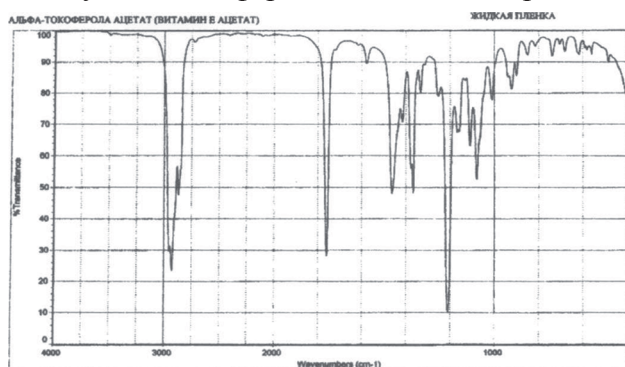


Рис. 6. ИК-спектр α -токоферола ацетата [12].

деления витамина Е из сложных многокомпонентных объектов, большой затраты времени и реактивов [4,5,7,21].

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Токоферолы обладают интенсивной флуоресценцией с максимумом возбуждения при 295 нм и излучения при 340 нм. На этом основаны спектрофлуориметрические методики определения токоферолов, отличающиеся высокой чувствительностью, специфичностью и простотой [4]. Метод флуориметрии используют при количественном определении α - и γ -токоферола в моно- и поливитаминных препаратах. Феназины - красители, полученные при конденсации о-хинонов с о-фенилендиамином, сильно флуоресцируют (λ_{ex} 298 нм, λ_{em} 330 нм) [7]. Этот способ не применим для определения β - и δ -токоферолов.

ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Метод поляриметрии дает важную информацию при анализе субстанции оптически активных веществ (α -токоферол), но не пригоден для анализа суммы изомеров оптически активных веществ без их предварительного разделения [5]. Ведущие зарубежные фармакопеи (ЕФ и Фармакопея США) рекомендуют проводить определение величины удельного вращения для 10 % раствора рацемической смеси α -токоферола и его ацетата в этаноле $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0,01^{\circ}$ до $+0,01^{\circ}$. Величину удельного вращения для RRR- α -токоферола по ЕФ определяют для 20 % раствора в диэтиловом эфире после его окисления гексацианоферратом калия до хинона - $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ не менее $+24^{\circ}$ [9-11,27]. Информация по применению данного метода для количественного определения токоферолов в научной литературе не обнаружена.

РЕФРАКТОМЕТРИЯ.

Предложен рефрактометрический способ определения α -токоферилацетата в препаратах витамина Е (концентрированные растворы в масле), ошибка которого не превышает 1 % в диапазоне концентраций 20 – 50 % масс. По сравнению с обращено-фазовой (ОФ) ВЭЖХ

метод снижает затраты времени с 2-3 ч. до нескольких минут, а потому он может быть рекомендован для выполнения серийных определений [1]. Однако, ограничением данного метода является минимально определяемый уровень содержания α -токоферилацетата в соевом масле приблизительно 15-20 % масс.

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ

Измерены спектры ЯМР ^1H токоферола ацетата в дейтерированном хлороформе. Проведено отнесение характерных сигналов спектров, что позволяет надежно идентифицировать его данным методом [29,30]. Для спектра токоферола ацетата характерно наличие триплетов протонов в положении 4 и 3 с химическими сдвигами $\delta=2,59$ и $1,77$ м.д. ($J_{3,4}=6,9$ Гц) соответственно, синглетов протонов метильных групп в положениях 5, 7 и 8 ($\delta=2,09$; $2,02$; $1,97$ м.д.) и в положении 2 ($\delta=1,23$ м.д.). Метильные протоны боковой цепи регистрируются в виде дублета при $\delta=0,86$ м.д. ($J=6,3$ Гц), а ацетатной группы – в виде синглета при $\delta=2,32$ м.д. Метиленовые и метиновые протоны боковой цепи наблюдаются в области $\delta=1,0 - 1,6$ м.д. Данный метод с успехом может использоваться для установления или подтверждения структуры отдельных изомеров токоферолов после их разделения.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Анализ литературных источников показал, что в начале второго десятилетия XXI века ведущее положение при определении жирорастворимых витаминов (в т.ч. витамина Е) занимают исключительно хроматографические методы. Наибольшее применение получили тонкослойная хроматография (ТСХ) [4,5,7,21,31-38] и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [5,7,39-59]. В мировой научной литературе около 95 % работ посвящено современным хроматографическим методам для контроля качества и стандартизации различных лекарственных средств [55-59].

Метод ТСХ в настоящее время в фармацев-

Характеристика условий хроматографического определения α -токоферола методом ТСХ.

№ п/п	Растворитель	Литература	Соотношения растворителей (мл)	R _f α -токоферола	R системы
1	Гексан – этилацетат	[4]	95 : 5	0,25	0,215
2	Гексан-этилацетат	[32]	37 : 3	0,29	0,320
3	Хлороформ – гексан	[21]	95 : 5	0,77	4,180
4	Бензол – гексан	[31]	95 : 5	0,42	2,850
5	Бензол – метиловый спирт	[21]	9 : 1	0,75	3,360
6	Хлороформ-этанол	[38]	3 : 1	0,94	4,600
7	Хлороформ-этанол	[38]	2 : 1	0,95	4,660
8	Хлороформ-этанол	[38]	1 : 1	0,97	4,800

тическом анализе токоферолов применяют для оценки подлинности и чистоты субстанций и лекарственных форм [4,5,7,21,31-38]. Группу токоферолов определяют по величинам R_f после хроматографирования в условиях, представленных в табл. 2. В качестве реагент-детекторов могут использоваться: реактив Эммера-Энгели – токоферолы окрашиваются в розовый или красный цвет на белом фоне [4,21,25,31]; растворы кислоты фосфорно-молибденовой – на желто-зеленом фоне наблюдается окрашивание в сине-голубой цвет; водный раствор нитрата серебра – на белом фоне токоферолы окрашиваются в красный цвет и водный раствор гексацианоферрата калия (III) – на синем фоне имеет место окрашивание в желто-оранжевый цвет [4,21,31]. Если используются хроматографические пластины с флуоресцином (GF₂₅₄ или HF₂₅₄), то идентификацию пятен после хроматографии проводят в ультрафиолете. Наблюдается интенсивно-голубое свечение. Эфиры токоферола выявляются только при нагревании [4,9-11]. Анализ данных табл. 1, показал, что наиболее подходящими для хроматографирования являются системы № 2 и 4, так как в этих условиях наблюдаются оптимальные значения величин R_f (от 0,3 до 0,6) [60]. Рассчитав величину полярности подвижных фаз (P), представленных в литературе, получали зависимость значения относительной подвижности α -токоферола от полярности элюента (рис. 7). Вид кривой свидетельствует о том, что существуют интервалы полярности системы от 0,3 до 2,8 и от 3,3 до 4,0, в которых величина R_f практически не меняется. При достижении полярности элюента 4,85, α -токоферол перестает удерживаться сорбен-

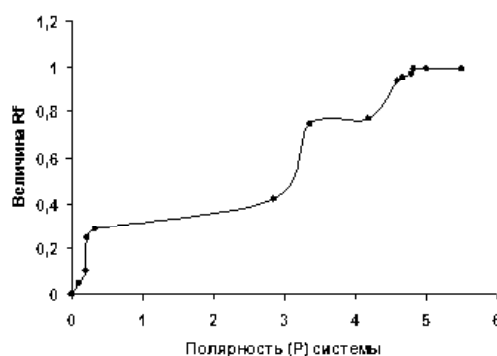


Рис. 7. Зависимость величины R_f α -токоферола от полярности подвижной фазы.

том и перемещается с током подвижной фазы (R_f → 1). Следовательно, наиболее оптимальные величины R_f получаются при использовании систем с полярностью от 0,3 до 3,0 единиц, описанные в литературе [31,32].

В последнее время стали появляться публикации, свидетельствующие о возможностях ТСХ для количественного анализа с применением специализированного программного обеспечения [31,32,38,61-63,64-71], не требующих наличия дорогостоящих аналитических приборов и позволяющих объективно количественно оценить содержание вещества при минимальных затратах времени [64]. Разработаны методики идентификации и количественного определения α -токоферола методом хроматографии в тонком слое сорбента с применением обработки сканированных хроматограмм компьютерной программой «Sorbfil Videodensitometer» [31,32,37,38].

Для определения токоферолов методом колоночной хроматографии наиболее удачным сорбентом является специально активи-

рованная окись алюминия. Хроматографию проводят в стеклянной трубке диаметром 10 мм, заполненной сорбентом высотой 80 мм. Если в пробе вместе с α -токоферолом содержатся каротиноиды, то их предварительно отделяют петролейным эфиром [4].

ВЭЖХ с использованием различных детекторов (спектрофотометрических, флуоресцентных, ИК-фурье, масс-спектрометрических) в последние годы получил более широкое признание в фармацевтическом анализе для количественного определения витамина Е [5,7,39-59]. В работе [43] авторы проводили определение гомологов витамина Е в растительном масле из плодов калины методом ВЭЖХ. Вид хроматограммы разделения токоферолов представлен на рис. 8. Пики, принадлежащие γ -, β - и α -токоферолом достаточно хорошо разделены, так как разрешение (R_s) больше двух.

В зарубежных государственных фарма-

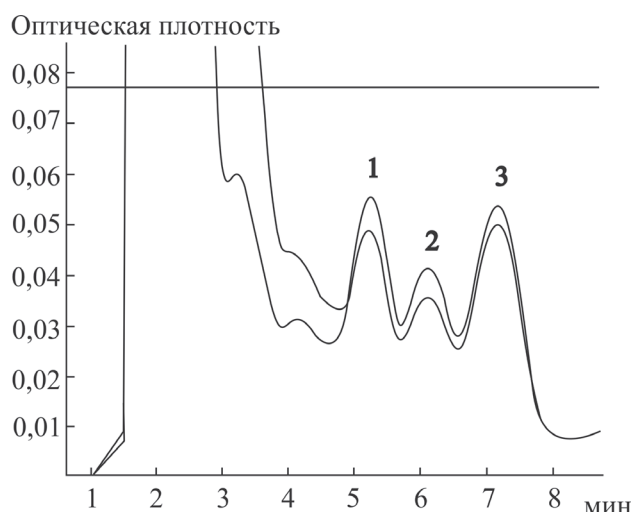


Рис. 8. Хроматограмма неомыляемой фракции масла калины. Пик 1 – γ -токоферол, 2 – β -токоферол, 3 – α -токоферол [43].

копях метод ВЭЖХ применяют в качестве основного метода определения витамина Е в лекарственных формах [27]. В USP 24 издания описаны три метода определения α -токоферола (табл. 2), различающиеся подготовкой пробы, а также качественным и количественным составом подвижной фазы. Детектирование осуществляют с помощью УФ-детектора при длине волны 285 нм.

Описаны методики совместного определения жирорастворимых витаминов в биологических объектах с помощью данного метода [5,7,39,44-58]. Хроматографическое определение витаминов А, D и Е выполняют на хроматографе «ХРОМ – 900» с использованием фотометрического детектора.

В USP 29 издания витамин Е в экстракте томатов определяют методом ВЭЖХ с использованием СФ-детектора (288нм) совместно с ликопином, β -каротином, суммой фитофлуена и фитоена [27]. Следует отметить, что в USP для витамина Е приводятся различные методики ВЭЖХ-анализа на различных колонках с использованием разных элюентов без указания объекта, к которому они применимы.

Описан способ определения жирорастворимых витаминов, исключающий стадию омыления [45]. Исследовались гетерогенные системы: этанол (96 %) – растительное масло с добавками витаминов (рис. 9). Детектирование токоферола проводили при 292 нм [45].

Для разделения этой группы веществ (токоферолов в растительном комплексе) на отдельные соединения более подходит нормально-фазовый вариант ВЭЖХ. Тогда как для отделения α -токоферола от других соединений этой группы более пригоден ОФ

Таблица 2

Примеры методик USP 24 анализа витамина Е в лекарственных формах.

№ п/п	Подвижная фаза	Подготовка пробы
1.	Метанол и 1 % водный раствор фосфорной кислоты (95:5)	Пятикратная экстракция гексаном из пробы, диспергированной в диметилсульфоксиде
2.	24 % метанол, 1 % воды, 0,05 % фосфорной кислоты в 50 % ацетонитриле	1 кратная экстракция изоктаном из H ₂ O – диметилсульфоксидометанольной пробы с постепенным добавлением компонентов
3.	Метанол : ацетонитрил : гексан (46,5 : 46,5 : 7,0)	Щелочной гидролиз с последующей 1 кратной экстракцией гексаном

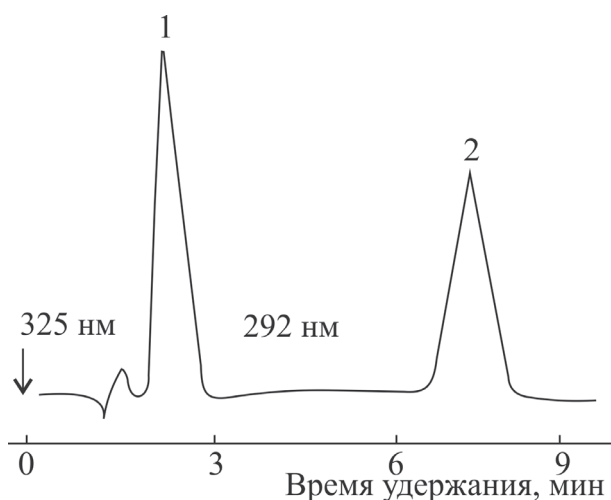


Рис. 9. Хроматограмма этанольной фазы гетерогенной системы этанол-растительное масло, содержащее ретинол и α -токоферол : 1-ретинол; 2- α -токоферол.

вариант ВЭЖХ как в градиентном, так и в изократическом режимах. В работе [52] проведено разделение смеси жирорастворимых витаминов на хроматографической колонке C_{18} с дополнительно привитыми полярными гидроксипропильными группами с применением полярной подвижной фазы в изократическом режиме элюирования (рис. 10). Данный тип сорбента позволяет осуществить прочное удерживание как гидрофобных, так и высокополярных соединений за счет водородных, полярных или электростатических взаимодействий [52].

Хроматографическое определение жирорастворимых витаминов (А, D_3 , Е) методом ОФ ВЭЖХ перспективно для решения аналитических задач в производственных условиях. В качестве объектов исследования

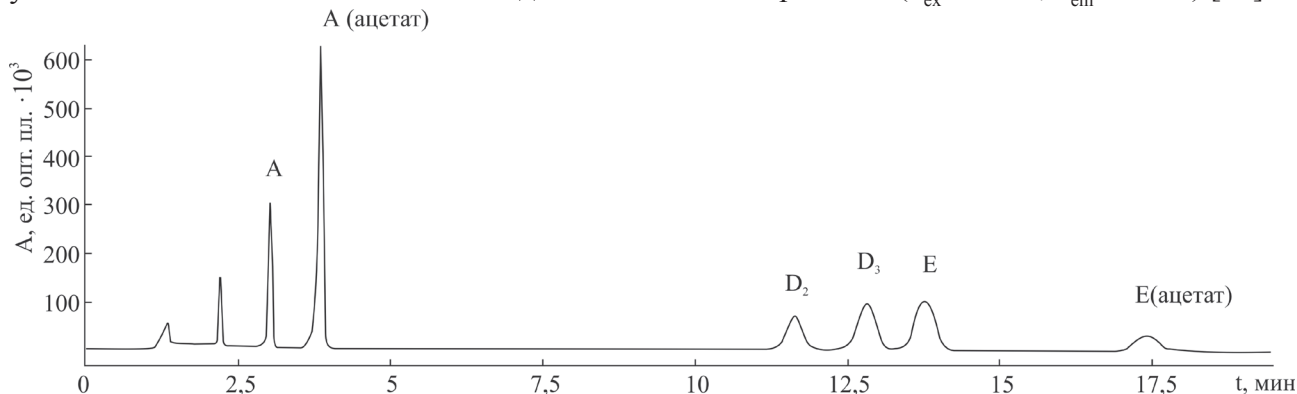


Рис. 10. Хроматограмма модельной смеси жирорастворимых витаминов. Подвижная фаза – этанол:вода:ацетонитрил (5:5:90). Концентрации компонентов смеси, мг/л: 500 – А; 180 – А (ацетат); 120 – D_2 ; 850 – Е; 500 – Е (ацетат). Необозначенные пики отнесены к примесям.

применяют фармакопейные препараты жирорастворимых витаминов. Идентифицируют пики по временам удерживания витаминов. Для разделения смеси жирорастворимых витаминов наилучшей является подвижная фаза состава вода – изопропиловый спирт в соотношении 30 : 70 (рис. 11). Объем вводимой пробы 1 мкл. Определение проводят по градуировочной зависимости высоты пика h (см) от содержания витамина Е (мг/мл) [45].

Авторами работы [49] изучено поведение витаминов Е и D_3 при совместном присутствии в условиях ОФ ВЭЖХ с использованием немодифицированных и модифицированных подвижных фаз. Для косвенного спектрофотометрического детектирования витаминов выбран ацетонитрил, модифицированный хлорофиллом (а+в) и тетрафенилпорфирином. При этом пределы обнаружения веществ с данным способом детектирования (нг) превосходят чувствительность УФ-детектора (мкг) и сравнимы с флуориметрическим (нг) детектированием.

Следует отметить, что в литературе отсутствует единый подход к способам пробоподготовки и определения жирорастворимых витаминов [52].

Метод ВЭЖХ нашел широкое применение также для оценки степени чистоты лекарственных препаратов, содержащих витамин Е. Разработаны методики определения изомеров токоферола в капсулах витамина Е (рис. 12) с применением нормально-фазового варианта ВЭЖХ и флуоресцентного способа детектирования (λ_{ex} 295 нм, λ_{em} 340 нм) [57].

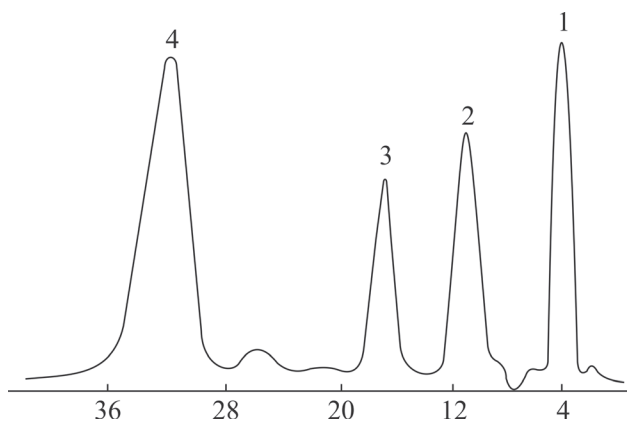


Рис. 11. Хроматограмма смеси жирорастворимых витаминов. Подвижная фаза- смесь воды и изопропанола (30:70): 1-витамин К₃ (0,24 мкг); 2-витамин А (2,0 мкг); 3-витамин D₃ (27 мкг); 4-витамин Е (64 мкг).

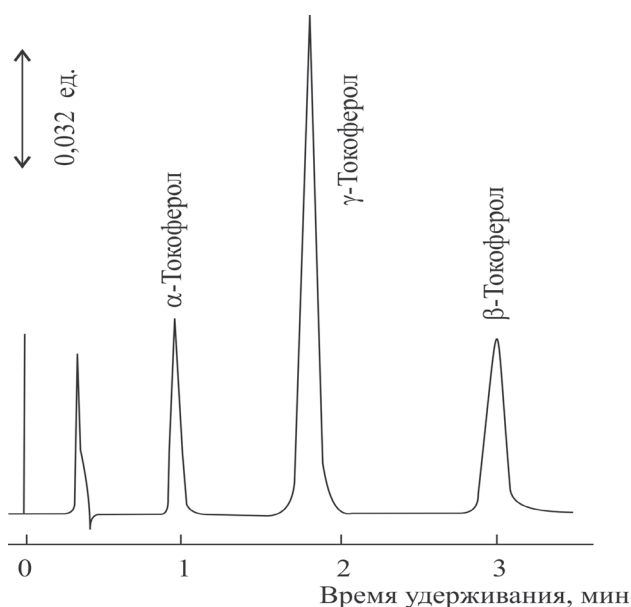


Рис. 12. Определение изомеров токоферола в капсуле витамина Е [57].

ВЭЖХ, в соответствии с современным уровнем развития фармацевтической науки, вытесняет спектральные методы анализа водо- и жирорастворимых витаминов. Так, в последнюю ГФ XII изд. (ч. II) включена ОФС «Количественное определение витаминов», в которой определение витамина Е после омыления пробы рекомендуется проводить методом ОФ ВЭЖХ с детектированием при 292 или 300 нм [72].

Несмотря на вышеперечисленные достоинства метода ВЭЖХ, высокая стоимость оборудования существенно ограничивает его применение в аналитических лабораториях

и центрах контроля качества [5,7]. Однако в последнее время наметилась тенденция к их оснащению современными приборами для проведения ВЭЖХ-анализа.

Метод газовой хроматографии (ГХ) успешно используется для определения витамина Е и часто рекомендуется для анализа субстанции и масляных растворов витамина Е [9-12,73,74]. В соответствии с ГФ XII [12] α-токоферола ацетат определяют методом ГЖХ с применением внутреннего стандарта дотриокантана и пламенно-ионизационного детектора. В Фармакопее США USP 30 описана методика определения α-токоферола, его ацетата и сукцината, а также смеси изомеров (β-,α-,δ- и γ-), полученной из растительных масел, методом ГЖХ с применением пламенно-ионизационного детектора. В качестве внутреннего стандарта в анализируемую пробу вводят гексадецилгексадеканат [27]. Следует отметить, что в предлагаемых условиях не наблюдается разделения пиков β- и γ-токоферолов. ГЖХ - экспрессный и точный метод анализа, однако, его основным недостатком является тот факт, что в нативном виде токоферолы не определяются. Необходима длительная предподготовка пробы, заключающаяся в предварительном переведении витамина Е в метиловый или пропиловый эфир, гептафторбутирильные или триметилсилилпроизводные, что увеличивает ошибку анализа [4,5,7,21]. Разработан прямой ГЖХ-анализ масляных растворов витамина Е с применением капиллярной хроматографии [73]. Однако, данные методы не получили широкого распространения на практике.

ДРУГИЕ МЕТОДЫ.

Описано определение содержания витамина Е в натуральных растительных маслах методом микрокалориметрии [75,76]. На модельной реакции инициированного окисления кумола показано, что жирные масла тормозят радикальную реакцию с периодом индукции, пропорциональным содержанию токоферолов в масле.

Таким образом, изучение и анализ литературных источников показал, что в контро-

ле качества субстанций и монокомпонентных препаратов витамина Е предпочтение отдано простым и доступным в выполнении методам анализа: титриметрии, УФ- и ИК-спектроскопии, фотоэлектроколориметрии, флуориметрии и рефрактометрии. Однако использование данных методов для качественного и количественного определения токоферолов в многокомпонентных лекарственных формах не всегда возможно, так как перед их проведением необходимо удалять сопутствующие соединения, что трудоемко, длительно, значительно увеличивает ошибку анализа, а также не всегда осуществимо. Хроматографические методы в последние годы занимают лидирующее положение в контроле качества токоферолов в виду их высокой селективности и универсальности. ВЭЖХ – наиболее быстрый и точный метод анализа для жирорастворимых витаминов, их изомеров и родственных соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Зенкевич И.Г. Рефрактометрическое определение α -токоферилацетата в препаратах витамина Е / И.Г. Зенкевич [и др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. — 2001. — Т.67. — №12. — С. 13-16.
2. Chandan K. Sen. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols / Chandan K. Sen, Sativa Khanna, Sashwati Roy // NIH Public Acces. — 2006. — 78(18). — P. 2088-2098.
3. Christen S. γ -tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO_x and complements α -tocopherol: physiological implications / A.A. Woodall [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. — 1997. — 94(7). — P. 3217-3222.
4. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю.М. Островского. — Минск.: «Наука и техника», 1979. — С. 18-53.
5. Лутцева А.И. Методы контроля и стандартизации лекарственных препаратов, содержащих жирорастворимые витамины (обзор) / А.И. Лутцева, Л.Г. Маслов, В.И. Середенко // Хим.-фарм. журн. — 2001. — Т. 35. — № 10. — С. 41 – 45.
6. Эшворт М.Р.Ф. Титриметрические методы анализа органических соединений / М.Р.Ф. Эшворт. — М.: Изд-во «Химия», 1968. — С. 230-231.
7. Михеева Е.В. Физико-химические методы определения витамина Е в различных объектах (обзор) / Е.В. Михеева, Л.С. Анисимова // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. — 2005. — Т.71. — №2. — С. 3-9.
8. Государственная фармакопея СССР. — М.: Медицина, 1968. — 10-е изд. — С. 707.
9. European Pharmacopoeia: Supplement, Strasbourg: Council of Europe, 1997. — 2 nd ed. — 1765 p.
10. European Pharmacopoeia: Supplement, Strasbourg: Council of Europe, 2001. — 3 rd ed. — 1705 p.
11. European Pharmacopoeia: Supplement, Strasbourg: Council of Europe, 2008. — 6 rd ed. — 3905 p.
12. Государственная фармакопея РФ. М.: Медицина, 2008. — 12-е изд. — Часть I. — С. 644-646.
13. Кайшев А.Ш. Антиоксидантная активность биокомпозиций на основе спиртовых отходов / А.Ш. Кайшев [и др.] // Фармация. — 2009. — №5. — С. 7-10.
14. Михеева Е.В. Содержание витамина Е в поливитаминных препаратах / Е.В. Михеева, Л.С. Анисимова, Н.П. Пикула // Фармация. — 2004. — № 5. — С. 16-17.
15. Михеева Е. В. Автореф. на соиск. уч. ст. канд. хим. наук / Е. В. Михеева // Томск, 2005.
16. Будников Г. К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии / Г. К. Будников, Г. К. Зиятдинова // Журн. Аналитической химии. — 2005. — Том 60. — № 7. — С. 678-691.
17. Будников Г.К. Определение некоторых жирорастворимых антиоксидантов методами кулонометрии и вольтамперометрии / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова, Д.М. Гильметдинова // Журн. Аналитической химии. — 2004. — Том 59. — № 7. — С. 736-741.
18. Зиятдинова Г. К. Реакции супероксид анион – радикала с антиоксидантами и их применение в вольтамперометрии / Г.К. Зиятдинова, Д. М. Гильметдинова, Г.К. Будников // Журн. Аналитической химии. — 2005. — Т. 60. — № 1. — С. 56-59.

19. Абдуллин И.Ф. Органические антиоксиданты как объекты анализа (обзор) / И.Ф. Абдуллин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников // Загородская лаборатория. Диагностика материалов. — 2001. — Т.67. — № 6. — С. 3-13.
20. Слепченко Г. Б. Контроль качества биологически активных добавок методами вольтамперометрии. Определение витаминов В₁, В₂, С, Е и кверцетина / Г. Б. Слепченко [и др.] // Хим.- фарм. журн. — 2005. — Т. 39. — № 3. — С. 54-56.
21. Надиров Н.К. Токоферолы и их использование в медицине и сельском хозяйстве / Н.К. Надиров. — М.: Наука, 1991. — 336с.
22. Государственная фармакопея XI изд. — М.: Медицина, 1990. — Вып. 2. — С. 57-58.
23. Беликов В. Г. Определение суммы токоферолов в масляном экстракте из проростков пшеницы / В. Г. Беликов, Л. Б. Губанова, Ю. В. Якимова // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». — Пятигорск. — 2006. — С. 158-159.
24. Маркова О. М. Определение суммы токоферолов в масле амаранта / О. М. Маркова, Т. Т. Лихота // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». — Пятигорск. — 2006. — С. 247-248.
25. Государственный Стандарт РФ, 30417-96. Методы определения массовых долей витаминов А и Е в растительных маслах, 1997. — 102 с.
26. «Таблетки Глутамевит покрытые оболочкой». ФС 42-2798-99.
27. Фармакопея США, 29-изд., 2009. - С. 329-331, 2272, 2455, 3183.
28. Мелентьева Г.А. Фармацевтическая химия некоторых природных веществ с сильным биологическим действием / Г.А. Мелентьева. — М.: Изд-во мед. института им. И. М. Сеченова, 1984. — С. 73-78.
29. Карташов В. С. Применение спектроскопии ЯМР ¹H для стандартизации и оценки качества лекарственных средств. Идентификация алифатических и алициклических витаминов / В. С. Карташов [и др.] // Фармация. — 1992. — № 5. — С. 24-26.
30. Карташов В.С. Идентификация лекарственных средств витаминов и их структурных аналогов методом спектроскопии ЯМР ¹³C / В.С. Карташов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 1998. — №3. — С. 44-46.
31. Бородина Е.В. Определение токоферолов методом тонкослойной хроматографии с применением программной обработки сканированных изображений хроматограмм / Е.В. Бородина [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2006. — Т. 6. — Вып. 3. — С. 411-414.
32. Бородина Е.В. Определение α-токоферола и эргокальциферола методом тонкослойной хроматографии / Е.В. Бородина [и др.] // Журн. аналитической химии, 2007. — Т.62. — №11. — С. 1181-1185.
33. Карцова Л.А. Совместное определение водо- и жирорастворимых витаминов высокоэффективной тонкослойной хроматографией с использованием водно-мицеллярной подвижной фазы / Л.А. Карцова, О.А. Королева // Журн. Аналитической химии. — 2007. — Т. 62. - № 3. - С. 281 – 286.
34. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Кирхнер. — М.: Мир, 1981. — С. 402-407.
35. Руководство по современной тонкослойной хроматографии / Под ред О.Г. Ларионова. — Москва, 1994. — 311 с.
36. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М. Шаршунова, В.Шварц, Ч. Михалец . М.:«Мир», 1980. — Т. 2. — 610 с.
37. Рыбакова О. В. Определение α-токоферола в жирных растительных маслах и масляных экстрактах методом хроматографии в тонком слое сорбента / О. В. Рыбакова, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Сборник материалов XIV национ. конг. «Человек и лекарство». — Москва, 2007. — С. 778.
38. Рыбакова О. В. Методы контроля качества витаминов группы D (обзор) / О. В. Рыбакова, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Хим.-фарм. журн. — 2008. — Т. 42. — № 7. — С. 38-44.
39. «Аевит в капсулах». ФС 42-1699-95.

40. «Аекол». ФС 42-3182-95.
41. Арбатский А. П. Определение витаминов в кормовых и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А. П. Арбатский, Г. Н. Афоньшин, В. М. Востоков // Журн. Аналитической химии. — 2004. — 59(12). — С. 1304-1307.
42. «Витамин Е в капсулах». НД 42-7843-97.
43. Гаврилин М. В. Оптимизация методик определения действующих веществ в масле из плодов калины / М. В. Гаврилин [и др.] // Хим.-фарм. Журн. — 2007. — Том 41. — №2. — С. 42-44.
44. Григорьев А. М. Новые экспресс-методики определения жирорастворимых витаминов в сиропе «Олиговит» и таблетках «Алфавит» методом ВЭЖХ / А.М. Григорьев [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2006. — Т. 6. — Вып. 1. — С. 62-69.
45. Денисова Л. В. Хроматографическое поведение жирорастворимых витаминов в режиме обращенной-фазовой жидкостной хроматографии с подвижной фазой вода – изопропанол / Л. В. Денисова [и др.] // Журн. Аналитической химии. — 1997. — Т. 52. — № 9. — С. 967 – 969.
46. Ключев С.А. Определение витаминов А и Е методом ВЭЖХ с предварительным равновесным распределением в двух несмешивающихся жидких фазах / С.А. Ключев // Журн. Аналитической химии. — 1996. — Т. 51. — № 9. — С. 961-963.
47. Кожанова Л.А. Определение водо- и жирорастворимых витаминов в поливитаминных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Л.А. Кожанова, Г.А. Федорова, Г.И. Барам // Журн. Аналитической химии. — 2002. — Т. 57. — № 1. — С. 49 – 54.
48. Козлов Э. И. Определение витаминов А, D, Е в поливитаминных препаратах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии / Э. И. Козлов [и др.] // Хим. – фарм. Журн. — 2003. — Т. 37. — № 10. — С. 50-53.
49. Лазарева Е.Е. Определение витаминов Е и D₃ в некоторых препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с косвенным спектрофотометрическим детектированием / Е.Е. Лазарева, Г.Д. Брыкина, О.А. Шпигун // Журн. Аналитической химии. — 2002. — Т. 57. — № 7. — С. 737-740.
50. Филимонов В.Н. Выбор трехкомпонентного элюента для определения жирорастворимых витаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в поливитаминных фармацевтических препаратах / В.Н. Филимонов [и др.] // Журн. Аналитической химии. — 2000. — Т. 55. — № 7. — С. 732-738.
51. Голубицкий Г.Б. Одновременное количественное определение водо- и жирорастворимых витаминов и консервантов с использованием колонки нового типа CHROMOLITH / Г.Б. Голубицкий // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. — 2008. — Т.74. — №3. — С. 10-15.
52. Пирогов А.В. Определение жирорастворимых витаминов в зерновых премиксах, блендах, таблетированных биологически активных добавках и медпрепаратах методом ВЭЖХ / А.В. Пирогов [и др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. — 2008. — Т.74. — №3. — С. 3-9.
53. Филимонов В.Н. Оптимизация и оценка применимости метода ВЭЖХ для подтверждения показателя качества поливитаминных фармацевтических препаратов / В.Н. Филимонов [и др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. — 2001. — Т.67. — №10. — С. 8-13.
54. Greenfield E. S. Isolation and Identification of Drugs / E.S. Greenfield [et al.] — London : Pharmaceutical Press, 1986. — Sec. Edd. — 1648 p.
55. De Lechneer A.P. Simultaneous detection of retinol and α -tocopherol in human serum by high performance liquid chromatography/ A.P. De Leenheer [et al.] // Journal of Chromatography A. — 1979. — №162. — P. 408-413.
56. Ruperez FJ. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices / FJ. Ruperez [et al.] // Journal of Chromatography A. - 2001. - № 935. - P. 45-69.

57. Гото М. Введение в микромасштабную ВЭЖХ / М. Гото, К. Джинно. — М.: Мир, 1989. — С. 216–222.
58. Шатц В.Д. ВЭЖХ: основы теории / В.Д. Шатц, О.В. Сахартова. — Рига.: Изд-во «Зинатне», 1988 — 390 с.
59. Sanchez-Perez A. Automated analysis of vitamin E isomers in vegetable oils by continuous membrane extraction and liquid chromatography-electrochemical detection / A. Sanchez-Perez [et al.] // *Journal of Chromatography A*. — 2000. — № 881 — P. 229-249.
60. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии / Ф. Гейсс. — М.: Мир, 1999. — 405 с.
61. Аналитическая хроматография / Под ред. К.И. Сакодынского. — М.: Химия, 1993. — 463 с.
62. Березкин В.Г. Количественная тонкослойная хроматография / В.Г. Березкин, Н.С. Бочков. — М.: Наука, 1980. — 183 с.
63. Высокoэффеkтивная тонкослойная хроматография / Под ред. А. Златкис, Р. Кайзер. — М.: Мир, 1979. — 245 с.
64. Герасимов А.В. Применение программной обработки сканированных изображений хроматограмм в количественной планарной хроматографии / А.В. Герасимов // *Журн. Аналитической химии*. — 2004. — Т. 59. — № 4. — С. 392-397.
65. Дмитриев А. Б. Количественная тонкослойная хроматография аминокислот с применением видеоденситометра / А. Б. Дмитриев, Т. Д. Мезенова // *Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции»*, - Пятигорск, — 2006. — С. 197-198.
66. Дмитриев А. Б. Градуировочные функции в количественной планарной хроматографии / А. Б. Дмитриев, Т. Д. Мезенова, Л. А. Водорезова // *Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции»*. - Вып. 62. — Пятигорск. — 2007. — С. 288-290.
67. Количественный анализ хроматографическими методами / Под ред. Э. Кэц. - М.: Мир, 1990. — 320 с.
68. Назарова А.А. Количественная оценка фосфолипидов методом ВЭТСХ с использованием компьютерного сканирования / А. А. Назарова [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. — 2003. — Т. 3. — Вып. 2. — С. 213-216.
69. Рудаков О.Б. Количественная тонкослойная хроматография / О.Б. Рудаков [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. — 2002. — Т. 2. Вып. 2. — С. 209-212.
70. Шеллард Э. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое / пер. с англ. М.П. Вольнец, Г.М. Варшала. — М.: Мир, 1971. — 192 с.
71. Сафонова Е. Ф. Автореф. на соиск. уч. ст. канд. хим. Наук / Е. Ф. Сафонова // Москва, 2004.
72. Финкельштейн Е.И. Методы количественного определения витаминов в лекарственных формах / Е.И. Финкельштейн, И.П. Рудакова, И.А. Самылина // *Фармация*. — 2007. — № 4. — С. 45-48.
73. Грибанова С.В. Определение витамина Е в лекарственных препаратах методом капиллярной газовой хроматографии / С.В. Грибанова [и др.] // *Фармация*. — 1992. — № 3. — С. 32 - 36.
74. Lechner M. Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis / M. Lechner, B. Reiter, E. Lorbeer // *Journal of Chromatography A*. — 1999. — №857. — P. 231-238.
75. Сизова Н.В. Определение витамина Е в растительных маслах методом микрокалориметрии / Н.В. Сизова, Н.Ю. Андреева, // *Хим.-фарм. журн.* — 2007. — Т. 41. — № 6. — С. 49 - 52.
76. Сизова Н.В. Снижение концентрации токоферолов в процессе окисления жирных масел / Н.В. Сизова // *Химия растительного сырья*. — 2009. — № 1. — С. 117-119.

Тринеева Ольга Валерьевна — кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ; e-mail: trineevaov@mail.ru.

Trineeva Olga V. — Associate Professor of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, candidate of pharm. sciences, Voronezh State University; e-mail: trineevaov@mail.ru.