

УДК 615.322

<https://www.doi.org/10.34907/IPQAI.2025.95.38.002>

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЭЖХ-МС АНАЛИЗА ВИТАМИНА D В СОСТАВЕ РЫБЬЕГО ЖИРА ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

В.В. Лопатин, кафедра Химии Института Фармации им. А.П. Нелюбина, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет)

vasilii_rabota@mail.ru

А.Н. Фетисова, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры Химии Института Фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет)

doctor.fan01@gmail.com

В современном мире рыбий жир используется как в лечебных, так и в профилактических целях. Рыбий жир находит свое широкое применение ввиду содержания большого количества биологически активных компонентов, в частности витаминов группы D. Однако, несмотря на разнообразие товаров рыбьего жира и современных требований к пищевому рыбьему жиру, оценка качества субстанции не является унифицированной и требует новых современных методов. Целью данной работы являлась валидация новой разработанной методики качественного и количественного определения витамина D на примере содержания в образцах препаратов «рыбий жир для внутреннего применения» и «рыбий жир Тева». В результате качественного анализа удалось установить, что в образцах содержится только витамин D₃. Витамин D₂ обнаружен не был. Количественный анализ показал, что концентрация витамина D₃ в образцах рыбьего жира отечественного производства находится в диапазоне 0,73–0,97 мкг/мл (29,2–38,8 МЕ). В образцах рыбьего жира Тева содержание находится в диапазоне 2,02–2,56 мкг/мл (80,8–102,4 МЕ). В результате качественного анализа, согласно методике ГФ XIV издания, также удалось установить только наличие витамина D₃. Его содержание в образцах рыбьего жира отечественного производства составляет от 0,690 мг/мл до 0,915 мг/мл (27,6–36,6 МЕ), в то время как содержание в образцах рыбьего жира зарубежного производителя – от 1,95 мкг/мл до 2,40 мкг/мл (78,0–96,0 МЕ). Разработанная методика анализа качественного и количественного содержания холекальциферола (витамина D₃) на основе комбинации ВЭЖХ-МС обладает высокой точностью выполнения и более быстрой пробоподготовкой.

Ключевые слова: валидация, рыбий жир, витамин D, ВЭЖХ, холекальциферол

В настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке имеется широкий ассортимент рыбьего жира, применяемого в медицинских целях для профилактики гиповитаминозов А и D, а также БАД, содержащих рыбий жир, являющийся источником ПНЖК и витаминов А, D, Е. Основной ассортимент представлен лекарственными формами для внутреннего применения – капсулы и масло для приема внутрь. Несмотря на разнообразие товаров рыбьего жира и современных требований к пищевому рыбьему жиру, оценка качества субстанции не является унифицированной и требует новых современных методов [1]. Общепринятые методики анализа жирорастворимых витаминов в жиросодержащих лекарственных препаратах, пищевых продуктах и БАД к пище чаще всего предусматривают гидролиз (омыление) проб с последующим анализом методами спектрофотометрии или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [2–7]. К числу их недостатков относят длительность и трудоемкость выполнения, а также сравнительно высокие погрешности получаемых результатов (на уровне 10–15% и выше) [7–8]. По мнению ряда авторов, к проблемам этой группы методик относится необходимость их валидации для разных типов объектов (в обсуждаемом случае для рыбьего жира и продуктов на его основе), а также аспект, связанный с существованием витаминов в различных формах, например D₂ и D₃ для витамина D. В ряде случаев методики предусматривают анализ только одной формы; их разделение затруднительно, и необходимы дополнительные стадии очистки (усугубляющие перечисленные недостатки) или применение более селективных способов детектирования (например, масс-спектрометрического, МС). О низкой воспроизводимости свидетельствуют, например, данные [6]: по результатам анализа витамина D

в 5 контрольных пищевых объектах в 6 различных лабораториях относительное стандартное отклонение результатов (RSD, %) составило 35–50%, а по данным [8], допустимые внутрилабораторные расхождения результатов измерений для методик анализа жирорастворимых витаминов находятся на уровне 20–35%, межлабораторные – на уровне 30–55%.

Цель данной работы – валидация новой методики качественного и количественного определения витамина D на примере содержания в образцах препаратов «рыбий жир для внутреннего применения» и «рыбий жир Тева».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись образцы лекарственных препаратов рыбьего жира разных серий (обобщенные результаты представлены далее как серии А и В) российского производства ООО «Тюльская фармацевтическая фабрика» и разных серий производства «Тева Фармасьютикал Воркс Прайвэт Лимитед Компани» (Венгрия) (обобщенные результаты представлены далее как серии С и D). Лекарственная форма препарата рыбьего жира отечественного производства – масло для приема внутрь, представляющее собой прозрачную маслянистую жидкость от светло-желтого до желтого цвета со специфическим непрогорклым запахом. Лекарственная форма препарата рыбьего жира производства Тева – мягкие желатиновые капсулы, заполненные желтоватой прозрачной, без видимых частиц,

маслянистой жидкостью с характерным запахом. Анализ проводили *методом ВЭЖХ-МС* со следующей новой разработанной *пробоподготовкой*: исследуемый образец рыбьего жира, точная навеска около 0,5 г, смешивали с внутренним стандартом (эргокальциферол) и 15 мл 39% этанольного раствора гидроксида калия. Затем смесь нагревали при 60°C в течение 40 минут. Далее переносили содержимое в делительную воронку и промывали 60 мл гексана. Встряхивали в течение 90 секунд. Удаляли слой воды и промывали еще два раза водой по 15 мл. Гексан пропускали через сульфат натрия, выпаривали досуха и растворяли в 10 мл метанола. Фильтровали через тефлонный мембранный фильтр 0,02 мкм. *Приборная база*: хроматограф фирмы Agilent LC QQQ 6460 (США) с масс-селективным детектором Agilent LC QQQ (Model K6460). Определение содержания витамина D₃ проводилось также согласно описанным в ФС.3.7.0001.18 Государственной фармакопеи XIV издания «Печени рыб масло жирное» методикам. Полученные масс-спектры считали идентифицированными при совпадении с библиотечными масс-спектрами Wiley MS (коэффициент подобия >90%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования качественного и количественного содержания витамина D₃ (холекальциферола) в образцах серии А и В лекарственного препарата рыбьего жира отечественного производства представлены на **рис. 1** и **2**. Из сравнения

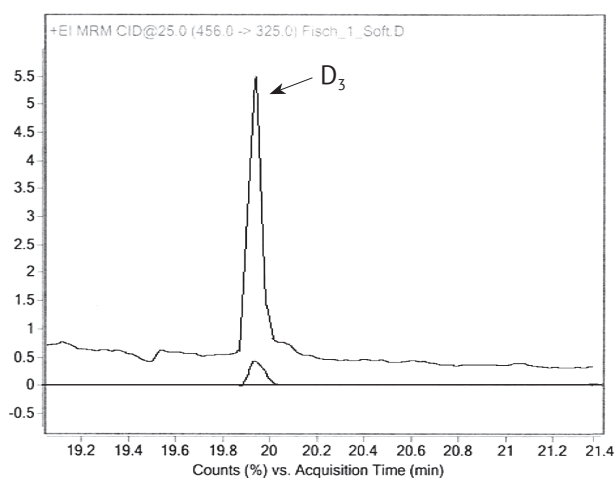


РИС. 1. Хроматограмма раствора холекальциферола в гексане образцов серии А. Время удерживания (минут): 19,9 – время удерживания витамина D₃

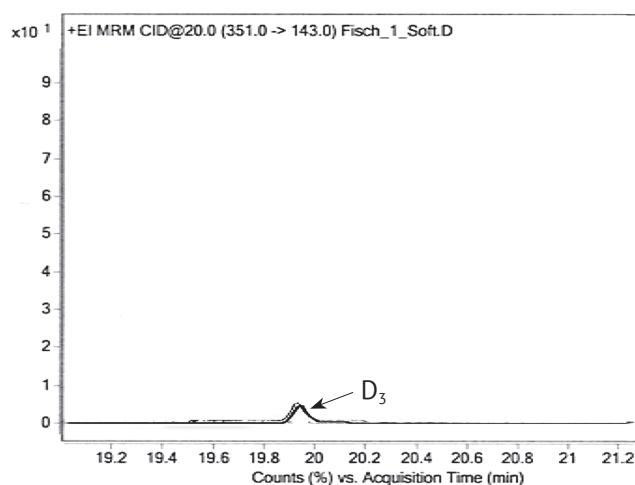


РИС. 2. Хроматограмма раствора холекальциферола в гексане образцов серии В. Время удерживания (минут): 19,9 – время удерживания витамина D₃

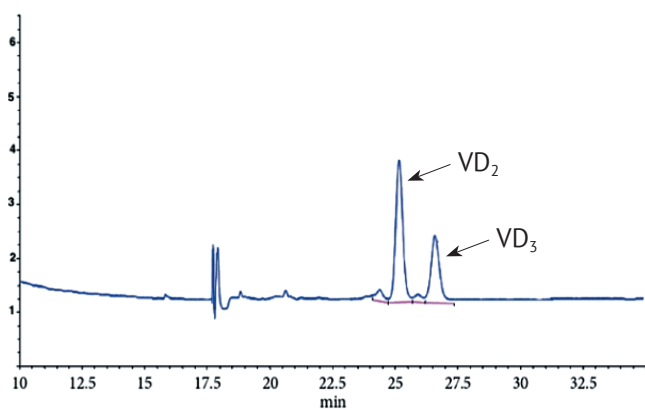


РИС. 3. Хроматограмма раствора холекальциферола в гексане образцов серии С. Время удерживания (минут): 26,6 – время удерживания холекальциферола

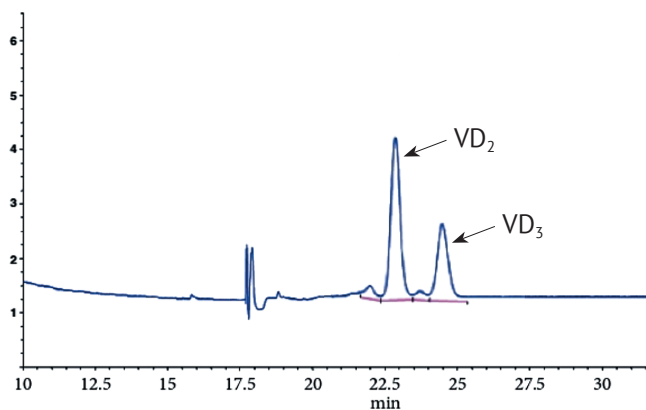


РИС. 4. Хроматограмма раствора холекальциферола в гексане образцов серии D. Время удерживания (минут): 24,6 – время удерживания холекальциферола

хроматограмм следует, что число пиков в образце серии А совпадает с числом пиков образцов серии В. Это означает, что образцы двух серий не отличаются по своему составу.

На рис. 3 и 4 приведены хроматограммы качественного определения холекальциферола в лекарственном препарате рыбьего жира производства Тева образцов серии С и D. Из сравнения хроматограмм следует, что число пиков в образце серии С совпадает с числом пиков образцов серии

D. Следовательно, образцы двух серий не отличаются по своему составу. Качественный анализ образцов всех 4-х серий показал, что исходно в образцах содержится только витамин D₃, витамин D₂ обнаружен не был.

Результаты сопоставительного статистического анализа содержания витамина D₃ в образцах рыбьего жира очищенного для внутреннего применения и рыбьего жира производства Тева представлены в табл. 1. Количественный анализ

Таблица 1

СОПОСТАВИТЕЛЬНЫЙ СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА D₃ В ОБРАЗЦАХ РЫБЬЕГО ЖИРА ОЧИЩЕННОГО ДЛЯ ВНУТРЕННЕГО ПРИМЕНЕНИЯ СЕРИЙ А И В И РЫБЬЕГО ЖИРА ТЕВА СЕРИЙ С И D

№ опыта	Содержание витамина D ₃ , мкг/мл (серия А)	Содержание витамина D ₃ , мкг/мл (серия В)	Содержание витамина D ₃ , мкг/мл (серия С)	Содержание витамина D ₃ , мкг/мл (серия D)
1	0,973	0,729	2,21	2,02
2	0,971	0,732	2,34	2,15
3	0,966	0,731	2,42	2,2
4	0,969	0,727	2,47	2,32
5	0,971	0,729	2,56	2,37
Метрологические характеристики (P=0,95, n=5)			Метрологические характеристики (P=0,95, n=5)	
\bar{x}	0,970	0,730	2,4	2,21
S	0,0273	0,0199	0,0112	0,009
S ²	0,0007	0,0004	0,0001	0,00008
$\Delta\bar{x}$	0,034	0,025	0,009	0,008
$\epsilon, \%$	3,5	3,4	0,4	0,3

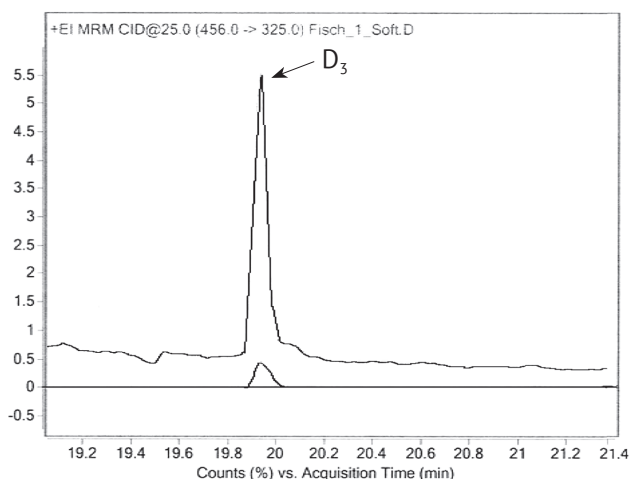


РИС. 5. Хроматограмма раствора витамина D_3 в гексане образцов препарата «рыбий жир очищенный для внутреннего применения». Время удерживания (мин): 19,9 – время удерживания холекальциферола

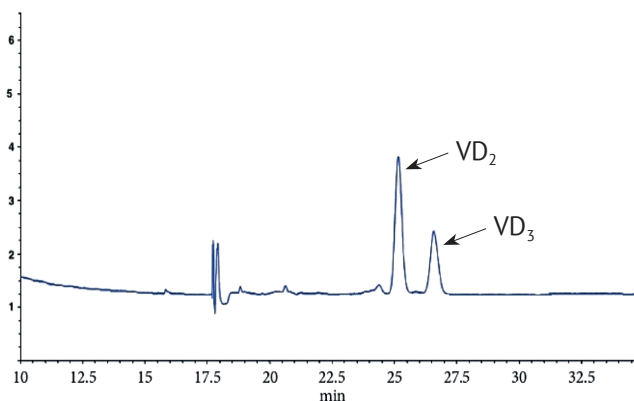


РИС. 6. Хроматограмма раствора витамина D_3 в гексане образцов препарата «рыбий жир Тева». Время удерживания (мин): 26,6 – время удерживания холекальциферола

показал, что концентрация витамина D_3 в образцах рыбьего жира отечественного производства находится в диапазоне 0,73–0,97 мкг/мл (29,2–38,8 МЕ), а в образцах рыбьего жира Тева – в диапазоне 2,02–2,56 мкг/мл (80,8–102,4 МЕ).

Определение содержания холекальциферола проводилось также согласно описанным в ФС.3.7.0001.18 Государственной фармакопеи XIV издания «Печени рыб масло жирное» методикам [2]. В результате анализа удалось установить, что содержание холекальциферола составляет от 0,690 мг/мл до 0,915 мг/мл (27,6–36,6 МЕ) в образцах рыбьего жира отечественного производства, а то время как содержание в образцах зарубежного производителя составляет от 1,95 мкг/мл до 2,40 мкг/мл (78,0–96,0 МЕ).

ВАЛИДАЦИЯ ВЭЖХ-МС МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА В ОБРАЗЦАХ ПРЕПАРАТОВ «РЫБИЙ ЖИР ОЧИЩЕННЫЙ ДЛЯ ВНУТРЕННЕГО ПРИМЕНЕНИЯ» И «РЫБИЙ ЖИР ТЕВА»

Валидация проводилась на примере содержания холекальциферола (рис. 5–6) как компонента препарата «рыбий жир очищенный для внутреннего применения» с наибольшим содержанием в анализируемой пробе.

Специфичность

При определении специфичности установлено, что пики других компонентов не мешают идентификации витамина D_3 . Критерии пригодности хро-

Таблица 2

КРИТЕРИИ ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИХ ВЫПОЛНЕНИЯ (ОБРАЗЦЫ СЕРИЙ А И В)

Критерии пригодности	Полученный результат
Пики других компонентов не мешают определению основного вещества	Соответствуют
На хроматограмме испытуемого раствора разрешение пика холекальциферола с любым другим пиком примеси в пробе должно быть более 1,5	Соответствует R_s (вит. D_3 /соп.в-ва) = 6,5
Число теоретических тарелок по пику холекальциферола	609293
Коэффициент асимметрии пика холекальциферола $T_{0,05}$	$T_{0,05} = 3,75$
RSD площади пика холекальциферола, рассчитанное по 5 экспериментальным хроматограммам	7,24%

КРИТЕРИИ ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИХ ВЫПОЛНЕНИЯ (ОБРАЗЦЫ СЕРИЙ С И D)

Критерии пригодности	Полученный результат
Пики других компонентов не мешают определению основного вещества	Соответствуют
На хроматограмме испытуемого раствора разрешение пика холекальциферола с любым другим пиком примеси в пробе должно быть более 1,5	Соответствует R_s (вит. D ₃ /соп.в-ва) = 1,92
Число теоретических тарелок по пику холекальциферола	17689
Коэффициент асимметрии пика холекальциферола $T_{0,05}$	1,16
RSD площади пика холекальциферола, рассчитанное по 3 экспериментальным хроматограммам	6,15%

матографической системы и экспериментальные результаты проверки их выполнения подтверждают, что показатели соответствуют такому параметру валидации, как специфичность (табл. 2–3).

Линейность

В 10 испытуемых образцах рыбьего жира отечественного производства и 6 образцах рыбьего жира производства Тева в выбранном диапазоне концентрации соотношение между площадями пиков опытных образцов прямо пропорционально содержанию в них витамина D₃ (рис. 7–8).

Прецизионность

Прецизионность оценивалась по характеристике повторяемости, промежуточной прецизионности

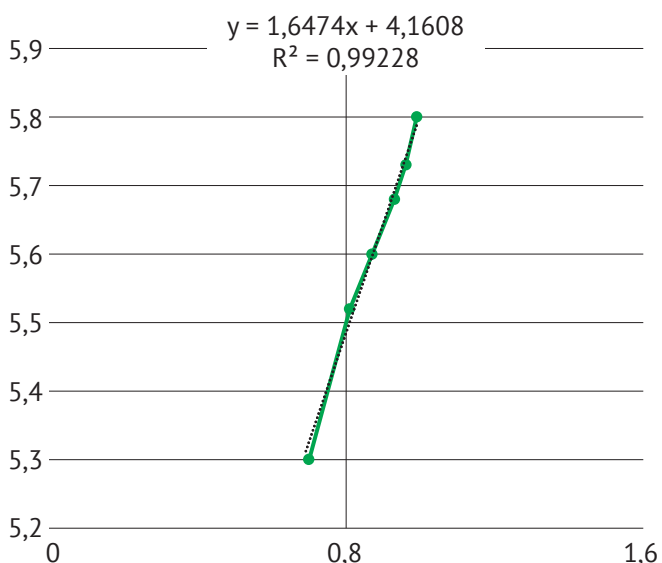


РИС. 7. Линейная зависимость содержания холекальциферола от высоты пиков на хроматограммах в образцах рыбьего жира отечественного производства

и дисперсии. Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность оценивалась путем определения содержания холекальциферола в исследуемых образцах препарата на двух разных приборах в разные дни. Результаты приведены в табл. 4–5.

Из полученных расчетных и экспериментальных данных следует, что дисперсии двух определений имеют незначительные отличия, следовательно, опытные данные сравнимы и методика достоверна. Доказано, что различие дисперсий не может быть признано значимым, методика воспроизводима, а результаты испытаний различаются незначительно.

В результате проведения анализа установлено, что разработанная методика не только более чувствительная, позволяя точнее определять со-

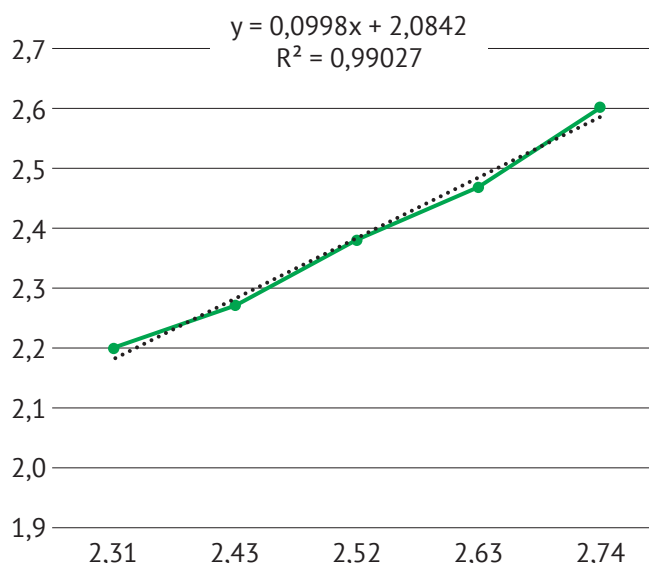


РИС. 8. Линейная зависимость содержания холекальциферола от высоты пиков на хроматограммах в образцах рыбьего жира производства Тева

Таблица 4

**СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ
(ПРЕПАРАТ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА)**

Статистические характеристики		Результаты	
		Прибор 1	Прибор 2
Содержание холекальциферола	Наименьшее значение, %	0,89	0,62
	Наибольшее значение, %	1,05	0,85
	Среднее значение, %	0,97	0,73
Стандартное отклонение		0,0206	0,0161
Коэффициент вариации, %		2,1	2,2
Доверительный интервал (при P=95%)		0,97±0,03	0,73±0,02
Относительная ошибка отдельного значения		3,0%	2,7%

держание холекальциферола, но и более простая в исполнении, не требует специального оборудования по сравнению с фармакопейной методикой. В частности, в фармакопейной методике необходимо использование водяной бани с обратным холодильником и ротационного испарителя, а также применение атмосферы с инертным газом при пробоподготовке к анализу холекальциферола.

ВЫВОДЫ

Разработанная методика анализа качественного и количественного содержания холекальциферола на основе комбинации ВЭЖХ-МС обладает высокой точностью выполнения, простотой

и более быстрой пробоподготовкой. Исследование может стать отправной точкой для дальнейшего анализа холекальциферола в образцах рыбьего жира российского производства с целью выявления более оптимальных и точных методов качественного и количественного анализа.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Косман В.М. Сравнительный анализ требований к качеству рыбьего жира для пищевого и медицинского применения / В.М. Косман, Д.В. Демченко, О.Н. Пожарицкая, А.Н. Шиков, В.Г. Макаров // Вопросы питания. – 2016. – №6. – С. 110–117.

Таблица 5

**СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ
(ПРЕПАРАТ ПРОИЗВОДСТВА ТЕВА)**

Статистические характеристики		Результаты	
		Прибор 1	Прибор 2
Содержание холекальциферола	Наименьшее значение, %	2,24	2,04
	Наибольшее значение, %	2,45	2,22
	Среднее значение, %	2,35	2,14
Стандартное отклонение		0,0112	0,0086
Коэффициент вариации, %		0,5	0,4
Доверительный интервал (при P=95%)		2,35±0,009	2,14±0,008
Относительная ошибка отдельного значения		0,4%	0,3%

2. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания: Том 4. – Москва, 2018. – URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения: 11.12.2024).
3. *European Pharmacopoeia*. 8th ed. / *European Pharmacopoeia Commission, Council of Europe*. – Strasbourg: EDQM, 2014.
4. *USP 38/NF33 The United States Pharmacopeia. The National Formulary / United States Pharmacopoeial Convention*. – Rockville, MD, 2014.
5. Blake C.J. *Committee on food nutrition // J. AOAC Int.* 2007. Vol. 90. P. 18B–21B.
6. *Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / Под ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна*. – М.: Брандес-Медицина, 1998. – 340 с.
7. *Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище*. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 240 с.
8. Byrdwell W.C., DeVries J., Exler J. et al. *Analyzing vitamin D in foods and supplements: methodologic challenges // Am.J. Clin. Nutr.* 2008. Vol. 88. P. 554S–557S.

VALIDATION OF THE HPLC–MS ANALYSIS OF VITAMIN D IN FISH OIL FOR MEDICAL USE

V.V. Lopatin, A.N. Fetisova

Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

In the modern world, fish oil is used both for therapeutic and prophylactic purposes. Fish oil is widely used due to the content of a large number of biologically active components, in particular vitamins of group D. However, despite the variety of fish oil products and modern requirements for food fish oil, the assessment of the quality of the substance is not unified and requires new modern methods. The purpose of this work is to validate the newly developed method for the qualitative and quantitative determination of Vitamin D using the example of the content in samples of the drug “fish oil for internal use” and “fish oil – Teva”. As a result of the qualitative analysis, it was possible to establish that the samples contain only Vitamin D₃. Vitamin D₂ was not detected. Quantitative analysis showed that the concentration of Vitamin D₃ in samples of domestically produced fish oil is in the range of 0.73 µg / ml – 0.97 µg / ml (from 29.2 IU to 38.8 IU). In samples of fish oil – Teva, the content varies in the range of 2.02 µg / ml – 2.56 µg / ml (from 80.8 IU to 102.4 IU). As a result of qualitative analysis, according to the methodology of the State Pharmacopoeia of the XIV edition, it was also possible to establish only the presence of vitamin D₃, but its content in samples of fish oil of domestic production ranges from 0.690 mg / ml to 0.915 mg / ml (from 27.6 IU to 36.6 IU), while the content of a foreign manufacturer ranges from 1.95 µg / ml to 2.40 µg / ml (from 78.0 IU to 96.0 IU). The developed method for analyzing the qualitative and quantitative content of cholecalciferol (Vitamin D₃) based on a combination of HPLC–MS has a high accuracy of execution and faster sample preparation.

Keywords: fish oil, quantitative analysis, cholecalciferol, HPLC–MS analysis, validation.