

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-87-99>
УДК 615.074; 615.356



Оригинальная статья / Research article

Разработка, валидация и применение методики количественного определения витамина D₃ (холекальциферола) методом ВЭЖХ с УФ-детектированием для анализа лекарственных средств и биологически активных добавок к пище

И. Е. Шохин¹, Е. А. Малашенко², Ю. В. Медведев^{1,2}, М. Н. Богачук^{3*}, С. А. Кулаков³, М. А. Палеева³

¹ ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

² ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

³ ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Россия, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14

*Контактное лицо: Богачук Мария Николаевна. E-mail: bmariyan@mail.ru

ORCID: И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Е. А. Малашенко – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>; Ю. В. Медведев – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>;

М. Н. Богачук – <https://orcid.org/0000-0002-5820-8336>; С. А. Кулаков – <https://orcid.org/0000-0001-5726-1111>; М. А. Палеева – <https://orcid.org/0000-0003-1453-9560>.

Статья поступила: 29.03.2021

Статья принята в печать: 24.05.2021

Статья опубликована: 25.05.2021

Резюме

Введение. Недостаточный рацион питания и проживание в северных регионах могут способствовать развитию дефицита витамина D и, как следствие, ряда заболеваний, приводящих к снижению иммунитета. В связи с этим уже достаточно долгое время применяются витаминные лекарственные препараты, содержащие витамин D в одной из его активных форм (чаще, в виде холекальциферола, витамина D₃).

Цель. Разработать и валидировать методику определения витамина D₃ в витаминных ЛП методом ВЭЖХ с диодноматричным детектированием, с последующим определением содержания холекальциферола в ряде лекарственных средств и биологически активных добавок к пище (БАД к пище), обращающихся на рынке РФ.

Материалы и методы. Определение витамина D₃ проводили методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 266 нм. Пробоподготовка витаминных лекарственных препаратов заключалась в экстракции метанолом (для жидких ЛФ на основе водных растворов и растворов триглицеридов) и водно-метанолным раствором (2 : 8 вода – метанол) – для твердых лекарственных форм на основе водорастворимых субстанций с витамином D₃.

Результаты и обсуждения. Была проведена валидация методики показателя «Количественное определение витамина D₃ (холекальциферола)» в витаминных препаратах методом ВЭЖХ по следующим параметрам: специфичность, правильность, линейность, диапазон применения, прецизионность.

Заключение. Разработана методика определения показателя «Содержание витамина D₃ (холекальциферола)» в витаминных лекарственных формах методом ВЭЖХ. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, правильность, линейность, диапазон применения, прецизионность. Показано, что результаты валидации удовлетворительны по всем указанным критериям. Диапазон применения методики 9,5–38 мкг/мл. Данная методика была использована для определения витамина D₃ в витаминных лекарственных препаратах на основе водорастворимых субстанций витамина D₃ в виде водных растворов и растворов триглицеридов жирных кислот.

Ключевые слова: витамин D₃, холекальциферол, ВЭЖХ, лекарственные средства, БАД, валидация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. Н. Богачук, М. А. Палеева, Ю. В. Медведев разработали и валидировали методику определения витамина D₃ и провели исследование образцов. С. А. Кулаков, И. Е. Шохин, Е. А. Малашенко проводили статистическую обработку и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Шохин И. Е., Малашенко Е. А., Медведев Ю. В., Богачук М. Н., Кулаков С. А., Палеева М. А. Разработка, валидация и применение методики количественного определения витамина D₃ (холекальциферола) методом ВЭЖХ с УФ-детектированием для анализа лекарственных средств и биологически активных добавок к пище. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):87–99. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-87-99>

HPLC-UV Method Development and Validation for Vitamin D₃ (Cholecalciferol) Quantitation in Drugs and Dietary Supplements

Igor E. Shohin¹, Evgeniya A. Malashenko², Yuri V. Medvedev^{1,2}, Maria N. Bogachuk^{3*}, Stanislav A. Kulakov³, Maria A. Paleeva³

¹ LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

² I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

³ Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14, Ustinskiy proezd, Moscow, 109240, Russia

*Corresponding author: Anastasiya O. Ponkratova. E-mail: anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ORCID: Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Evgeniya A. Malashenko – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>; Yuri V. Medvedev – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>;

Maria N. Bogachuk – <https://orcid.org/0000-0002-5820-8336>; Stanislav A. Kulakov – <https://orcid.org/0000-0001-5726-1111>; Maria A. Paleeva – <https://orcid.org/0000-0003-1453-9560>.

Received: 29.03.2021

Revised: 24.05.2021

Published: 25.05.2021

© Шохин И. Е., Малашенко Е. А., Медведев Ю. В., Богачук М. Н., Кулаков С. А., Палеева М. А., 2021

© Shohin I. E., Malashenko E. A., Medvedev Yu. V., Bogachuk M. N., Kulakov S. A., Paleeva M. A., 2021

Abstract

Introduction. An inadequate diet and living in the northern regions can lead to a lack of vitamin D₃ and the development of diseases, including a decrease in immunity. To compensate for the lack of vitamin D, vitamin drugs are used that contain vitamin D in one of its active forms (usually in the form of cholecalciferol, vitamin D₃).

Aim. To develop and validate HPLC-UV method for the determination of vitamin D₃ in vitamin drugs and to evaluate the content of cholecalciferol in selected drugs and dietary supplements presented in the Russian Federation.

Materials and methods. Determination of vitamin D₃ was carried out by HPLC with UV detection at a wavelength 266 nm. Sample preparation of vitamin drugs was carried out by extraction with methanol (for liquid dosage forms based on aqueous or triglyceride solutions) and extraction with an aqueous-methanol solution (for solid dosage forms based on water-soluble substances with vitamin D₃) in a ratio of 2 to 8 (water-methanol).

Results and discussions. The analysis methodology for the parameter "Vitamin D₃ (cholecalciferol) content" in vitamin dosage forms by HPLC was validated according to the following validation parameters: specificity; accuracy; precision; linearity; range.

Conclusion. The analysis methodology for the parameter "Vitamin D₃ (cholecalciferol) content" in vitamin dosage forms by HPLC was developed. The method was validated according to the following validation parameters: specificity; accuracy; precision; linearity; range. The range of the method was 9,5–38 µg/ml. The method was used to determine vitamin D₃ in vitamin drugs based on water-soluble forms of vitamin D₃, in the form of aqueous solutions and form of fatty acids triglyceride solutions.

Keywords: vitamin D₃, cholecalciferol, HPLC, drugs, dietary supplements, validation

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Maria N. Bogachuk, Maria A. Paleeva, Yuri V. Medvedev developed and validated a method for the determination of vitamin D₃ and carried out a study of samples. Stanislav A. Kulakov, Igor E. Shokhin, Evgeniya A. Malashenko carried out statistical processing and interpretation of the results. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the article.

For citation: Shohin I. E., Malashenko E. A., Medvedev Yu. V., Bogachuk M. N., Kulakov S. A., Paleeva M. A. HPLC-UV method development and validation for vitamin D₃ (cholecalciferol) quantitation in drugs and dietary supplements. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):87–99. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-87-99>

ВВЕДЕНИЕ

Витамин D на современном уровне развития биохимии уже не относят к витамину в классическом понимании этого термина. Его рассматривают как стероидный прогормон, который превращается в организме в активные метаболиты [1, 2]. Известно, что витамин D имеет два пути поступления в организм человека: с пищей (витамины D₂ и D₃) и в результате синтеза в коже под влиянием ультрафиолетового облучения (витамин D₃). Бедный рацион питания и проживание в северных регионах могут способствовать развитию у человека дефицита витамина D и, как следствие, ряда заболеваний, приводящих к снижению иммунитета. В связи с этим уже достаточно долгое время применяются витаминные лекарственные препараты, содержащие витамин D в одной из его активных форм (чаще, в виде холекальциферола, витамина D₃) (рисунок 1) [3].

Витамин D₃ входит в состав различных ЛФ ЛП и БАД к пище в виде водорастворимых субстанций (например, витамин D₃ 100 SD/S, производства компании DSM Nutritional Products Ltd., Швейцария) или жирорастворимых форм, растворенных в чистых или водно-спиртовых растворах триглицеридов или растительном масле/рыбьем жире [4]. Российский рынок витаминных препаратов, содержащих в своем составе витамин D₃, в последнее время расширяется стремительно. Особенно это заметно на примере витаминных БАД к пище, в том числе с холекальциферолом в своем

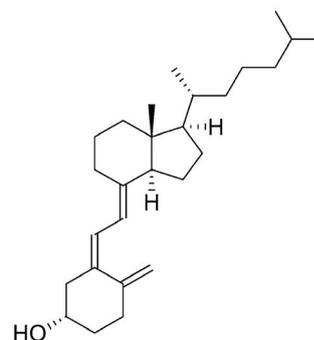


Рисунок 1. Структурная формула витамина D₃ (холекальциферола)

Figure 1. Structural formula of vitamin D₃ (cholecalciferol)

составе [5]. Помимо этого, производители специализированной пищевой продукции тоже стремятся идти в ногу со временем, и число продуктов, обогащенных витамином D₃, также развивается.

Холекальциферол достаточно нестабилен на свету и в среде, богатой кислородом. В связи с этим многостадийная подготовка проб может способствовать его разрушению и изомеризации в стеринны [1, 6–8]. Классический подход для подобных объектов описан в ГОСТ 32043-2012. Подготовка проб в данном ГОСТ проводится путем омыления водно-спиртовым раствором калия гидроксида, экстракция – гексаном и последующее определение витамина D (в формах и

D₂, и D₃) – методом нормально-фазовой хроматографии [9].

Поскольку для производства витаминных ЛП, содержащих витамин D, используют водорастворимые субстанции и чистые или водно-спиртовые растворы триглицеридов, то для уменьшения потерь витамина D на этапе пробоподготовки стадию омыления опускают, переходя сразу к экстракции холекальциферола подходящим экстрагентом. Помимо этого, используют обращено-фазовую систему для хроматографирования витамина D₃ [4].

В настоящем исследовании показана разработка, валидация методики количественного определения холекальциферола в моновитаминных ЛП (таблетированных и жидких ЛФ) и применение методики для оценки содержания холекальциферола в ряде лекарственных средств и биологически активных добавок к пище (БАД к пище), обращающихся на рынке РФ.

Цель исследования. Разработать и валидировать методику определения витамина D₃ в витаминных ЛП методом ВЭЖХ с диодноматричным детектированием, а затем с её помощью оценить содержание холекальциферола в ряде лекарственных средств и биологически активных добавках к пище (БАД к пище), обращающихся на рынке РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение витамина D₃ проводили с использованием следующего оборудования:

Основное оборудование:

- высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent 1100 с диодноматричным детектором (з/н DE40521679/DE40915278) (США);
- весы лабораторные электронные GH-120 I кл. т. 0,1 мг, до 120 г (з/н 15101394) (A&D Company Ltd., Япония);
- дозатор пипеточный одноканальный переменного объема Eppendorf Research 500–5000 мкл (з/н 4146697) (Eppendorf, ФРГ);
- дозатор переменного объема одноканальный Eppendorf Research 100–1000 мкл, (з/н 1581088) (Eppendorf, ФРГ).

Вспомогательное оборудование:

- лабораторная система очистки воды Milli-Q (з/н F8KN02139A) (Millipore, Франция);
- ванна ультразвуковая Bandelin RK 31 (sn: 329.00072514.029) (Bandelin electronic, Германия);
- баня водяная STEGLER WB-2 с возможностью фиксации постоянной температуры;
- шейкер вибрационный типа Vortex (ELMI, Латвия);
- центрифуга типа 5424 Eppendorf (максимальное вращение до 20000 об/сек) з/н 16934300 (Eppendorf, ФРГ);
- стаканы стеклянные вместимостью 500 мл;
- колбы мерные класса «А» вместимостью 10 мл;
- ступка и пестик керамические.

Реактивы и растворы

Для проведения исследования были использованы следующие стандартные образцы и химические реактивы: стандартный образец холекальциферол (витамин D₃) (Sigma-Aldrich, США, CAS № 67-97-0, lot. LRAB2929); субстанция холекальциферола 100 SD/S (DSM Nutritional Products GmbH, Германия, серия № 11с/2397-10/0319); ацетонитрил (Panreac Quimica S.L.U, Испания, класс HPLC-gradient п. 361881.1612, годен до 06.2023 г.); кислота муравьиная 99 %, п. 270480010 (Acros Organics, Финляндия, годен до 20.04.2021 г.); метанол (ООО ТД «ХИММЕД», Россия, класс чистоты «х.ч.»), годен до 06.2021 г.; вода очищенная.

Объекты исследования

Для оценки количественного содержания холекальциферола разработанной методикой в реальных образцах были исследованы следующие лекарственные витаминные препараты: «Аквадетрим» водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023, серия № 050420); «Аквадетрим» таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022, серия № 170420), а также витаминные БАД к пище: «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022, серия № 1913870002); «Детримакс 1000 МЕ» таблетки, производства «Игл Нутришнайс Инк» (годен до 02.2022, серия № WJ141); «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023, серия № 260220).

Подготовка проб и растворов

Подвижная фаза (ПФ). В качестве ПФ использовали смесь ацетонитрила и 0,1%-го раствора муравьиной кислоты в процентном соотношении (70:30) в градиентном элюировании. Для приготовления 0,1%-го раствора муравьиной кислоты в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали около 400 мл воды очищенной, 1 мл муравьиной кислоты и перемешивали. Затем доводили объем полученного раствора до метки водой очищенной и перемешивали. Хранили раствор в течение 30 суток.

Исходный и рабочий растворы стандартного образца (СО). Около 20 мг холекальциферола (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли около 40 мл метанола и перемешивали до полного растворения вещества. Затем доводили объем раствора в колбе до метки метанолом и перемешивали (исходный раствор).

5,0 мл исходного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора в колбе до метки метанолом и перемешивали. Растворы использовали в течение 10 суток после приготовления при условии хранения в морозильной камере при температуре не выше –20 °С и обертывали

вания пробок и горлышка колбы парафином, а самой колбы – фольгой.

Экстракция. В мерную колбу вместимостью 10 мл отвешивали навеску препарата (50–500 мг). Затем прибавляли 2 мл воды очищенной, укупоривали и тщательно перемешивали на вибрационном шейкере. Колбы помещали на водяную баню на 10 минут при температуре не более чем 60 °С. После в колбу вносили 5 мл метанола, укупоривали и тщательно встряхивали получившийся раствор, при необходимости помещали на водяную баню при температуре не более чем 60 °С, затем доводили метанолом до метки и перемешивали не менее 20 раз.

Для жидких образцов, представляющих собой водные растворы и растворы триглицеридов с внешним холекальциферолом, в мерную колбу отвешивали навеску препарата (50–500 мг). Прибавляли 5 мл метанола и тщательно перемешивали на вибрационном шейкере. Затем доводили метанолом до метки. Перемешивали не менее 20 раз.

Далее аликвоту переносили в пробирки типа Eppendorf на 2 мл и центрифугировали при 14000 об/сек. 10 минут или фильтровали через шприцевой фильтр в виалу. Полученные растворы анализировали свежеприготовленными.

Условия проведения анализа методом ВЭЖХ с УФ-детектированием

Условия проведения анализа методом ВЭЖХ с УФ-детектированием были подобраны в процессе эксперимента и представлены в таблице 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

При разработке методики количественного определения было отмечено, что на колонках с октадецилсиликагелевым сорбентом происходит наложение времен удерживания природных токоферолов, используемых в качестве антиокислителей и стабилизаторов витамина D в субстанциях для производства витаминных ЛП, и определяемого витамина D₃. Тогда как колонка с полиароматическими углеводородами в качестве сорбента (ZORBAX Eclipse PAH Narrow Bore 2,1 × 150 мм, 3,5 мкм) позволяет разделить все компоненты матрицы [10].

Изократический режим элюирования на колонке с полиароматическими углеводородами не позволил получить удовлетворительные результаты по эффективности разделения компонентов матрицы [число теоретических тарелок (ЧТТ) было менее 5 тысяч], тогда как градиентный режим элюирования позволил повысить ЧТТ до 20 тысяч и более.

Подобранный режим градиентного элюирования показан в таблице 2.

Поскольку витамин D₃ имеет специфический спектр и характерный для него максимум поглощения (266 нм), а концентрация его в ЛП достаточно высока, то УФ-детектор вполне подходит для регистрации сигнала витамина D₃.

Таблица 1. Условия хроматографического определения витамина D₃

Table 1. Conditions for the chromatographic determination of vitamin D₃

Параметр Parameter	Значение Value
ПФ Mobile phase	Смесь ацетонитрила и 0,1%-го раствора муравьиной кислоты в процентном соотношении (70:30) в градиентном элюировании A mixture of acetonitrile and 0.1 % formic acid solution in percentage (70:30) in gradient elution
Скорость потока ПФ Mobile phase flow rate	0,8 мл/мин 0,8 ml/min
Хроматографическая колонка Chromatographic column	ZORBAX Eclipse PAH Narrow Bore 2,1 × 150 мм, 3,5 мкм ZORBAX Eclipse PAH Narrow Bore 2.1 × 150 mm, 3,5 μm
Температура колонки Column temperature	40 °С
Объем инжектируемой пробы, мкл Injected sample volume, μl	2
Длина волны детектирования, нм Detection wavelength, nm	266
Время удерживания, мин t _R Retention time, min t _R	12,4
Общее время анализа, мин Total analysis time, min	15

Таблица 2. Режим градиентного элюирования

Table 2. Gradient elution mode

Время хроматографирования, мин Chromatography time, min	ПФ А (0,1%-й раствор муравьиной кислоты), % Mobile phase A (0.1 % formic acid solution), %	ПФ Б (ацетонитрил), % Mobile phase B (acetonitrile), %
0	30	70
2	30	70
10	0	100
12	0	100
14	30	70
15	30	70

Валидация методики

Валидацию методики показателя «Количественное определение витамина D₃ (холекальциферола)» в витаминных препаратах методом ВЭЖХ проводи-

ли на основе ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи РФ XIV издания, Руководства по валидации аналитических методик ЕАЭС от 17.07.2018 г. и РМГ 61-2010 по следующим параметрам:

- специфичность;
- правильность;
- линейность;
- диапазон применения;
- прецизионность.

Специфичность

Подтверждение специфичности проводили сравнением хроматограмм растворителя, раствора плацебо, стандартного раствора и тест-раствора, содержащего все компоненты препарата [11]. Специфичность аналитической методики доказана, если выполняются следующие условия:

- ✓ Требования пригодности хроматографической системы должны полностью выполняться.
- ✓ Компоненты растворителя и плацебо не должны препятствовать определению количественного содержания холекальциферола в растворе (рисунки 2–4).
- ✓ Пики плацебо имеют с пиком холекальциферола разрешение более 1,5 и (или) изменяют результат определения холекальциферола менее чем на 0,5 % [12].

Согласно полученным результатам, на хроматограммах растворителя и плацебо отсутствуют пики со временем удерживания, характерным для холекальциферола.

Для раствора СО эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику холекальциферола, составила более 35 000 теоретических

тарелок; фактор асимметрии пика холекальциферола – менее 1,00.

Специфичность аналитической методики доказана, так как удовлетворяются требования пригодности хроматографической системы, компоненты плацебо и растворителя не препятствуют определению количественного содержания холекальциферола в растворе.

Линейность

Раствор концентрированного стандартного образца. Около 19,0 мг (точная навеска) стандартного образца холекальциферола помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл метанола, обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин, довели объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали (стандартный раствор).

Приготовление калибровочных стандартных растворов

Испытуемые калибровочные растворы готовили путем разбавления метанолом в мерных колбах исходного концентрированного раствора стандартного образца. Конечные концентрации растворов составили: 38 мкг/мл, 31,7 мкг/мл, 27,1 мкг/мл, 23,8 мкг/мл, 21,2 мкг/мл, 19 мкг/мл и 9,5 мкг/мл.

Аналогично готовили растворы для определения линейности с использованием стандартного образца холекальциферола (Sigma-Aldrich, США). Пример хроматограммы стандарта представлен на рисунке 5.

Критерии приемлемости:

- ✓ Наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации холекальциферола.
- ✓ Коэффициент корреляции $r_{xy} \geq 0,99$ [13].

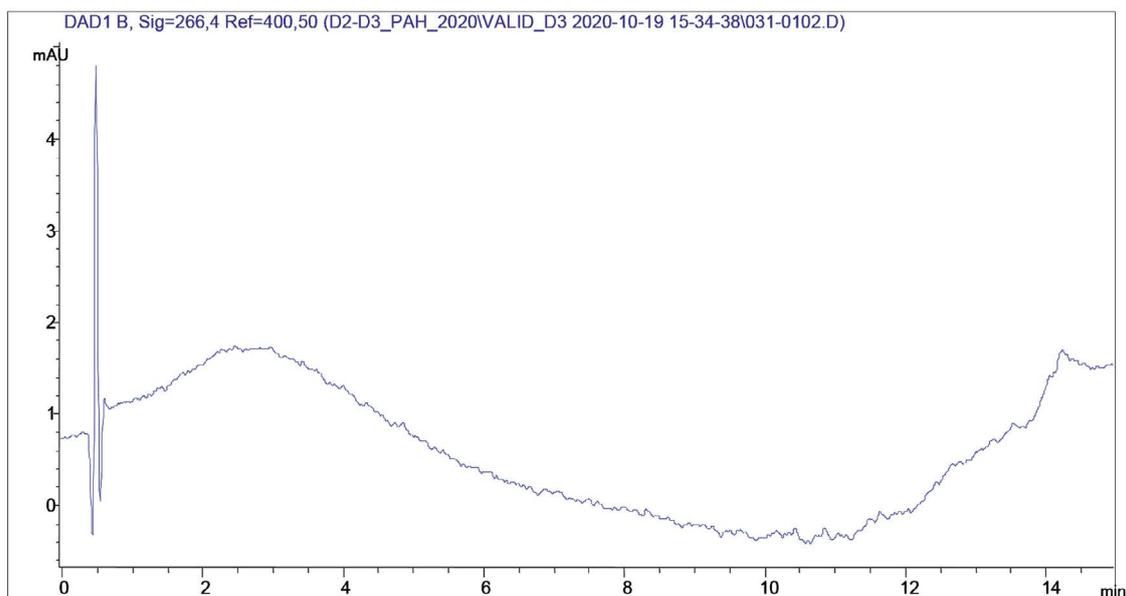


Рисунок 2. Хроматограмма экстрагента (метанола)

Figure 2. Chromatogram of the extractant (methanol)

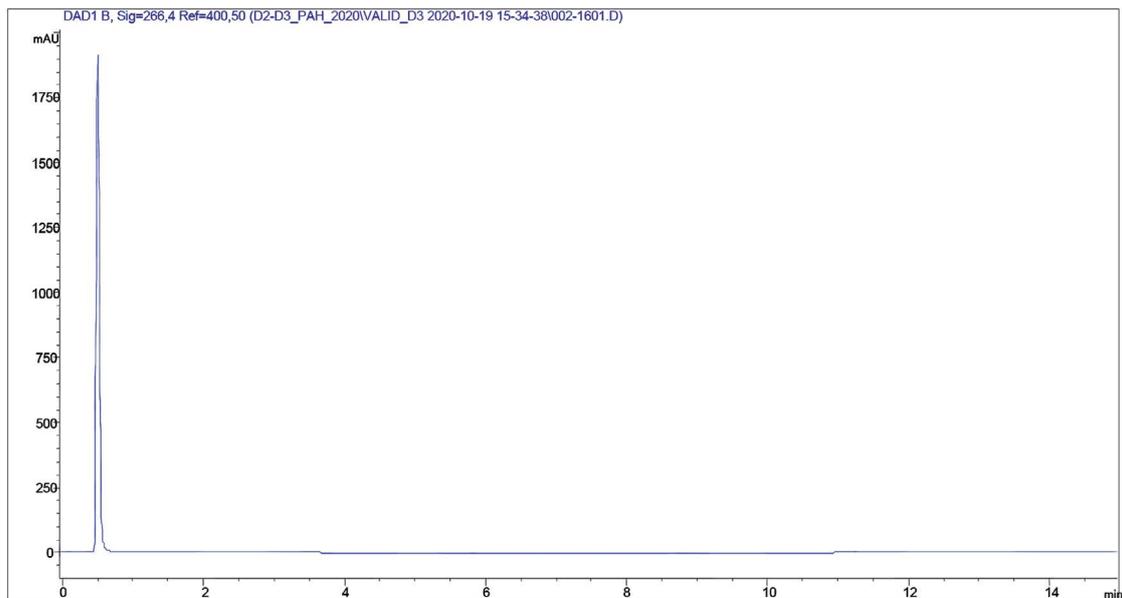


Рисунок 3. Хроматограмма сухого плацебо (таблеточная смесь «Аквадетрим», производства ООО «Акрихин»)

Figure 3. Chromatogram of dry placebo (tablet mixture Akvadetrim, produced by LLC Akrikhin)

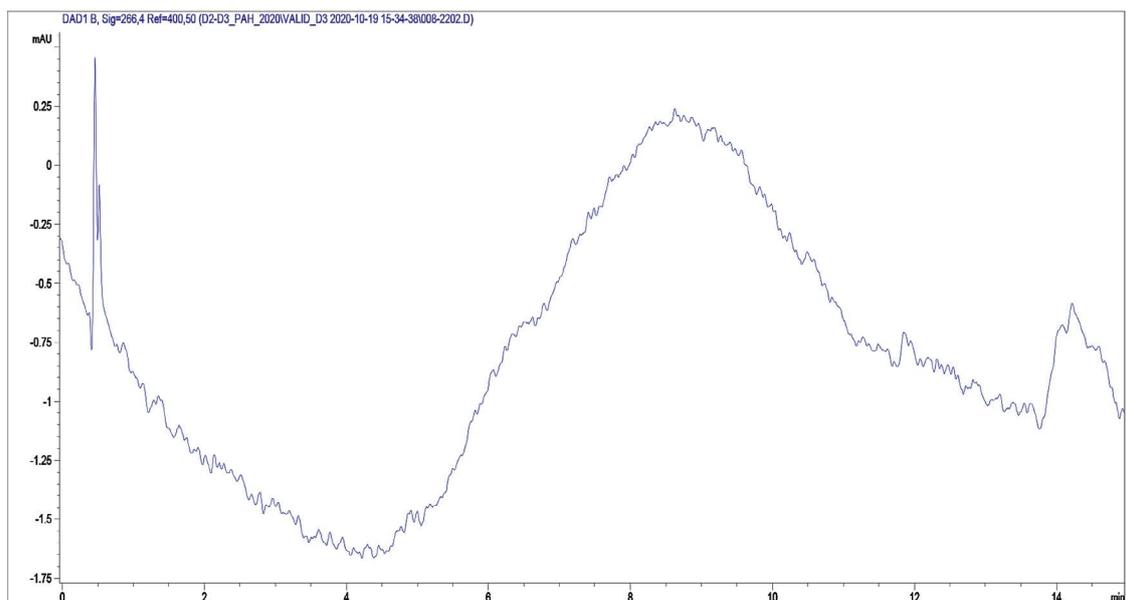


Рисунок 4. Хроматограмма жидкого плацебо (вода очищенная)

Figure 4. Chromatogram of liquid placebo (purified water)

Проводили анализ 7 образцов калибровочных растворов с концентрациями 38 мкг/мл, 31,7 мкг/мл, 27,1 мкг/мл, 23,8 мкг/мл, 21,2 мкг/мл, 19 мкг/мл и 9,5 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 4 раза. Градуировку проводили методом абсолютной калибровки. Калибровочная зависимость отношения площади пика холекальциферола от его концентрации описывалась уравнением вида $y = bx + a$. По полученным значениям были построены калибровочные

графики. Калибровочные графики приведены на рисунке 6 (таблица 3).

Коэффициент корреляции для калибровочного графика $r_{xy} = 0,9990$, что соответствует установленной норме (не менее 0,9900).

По экспериментально измеренным значениям переменной y для заданных значений аргумента x с использованием регрессионного анализа рассчитаны коэффициенты a и b :

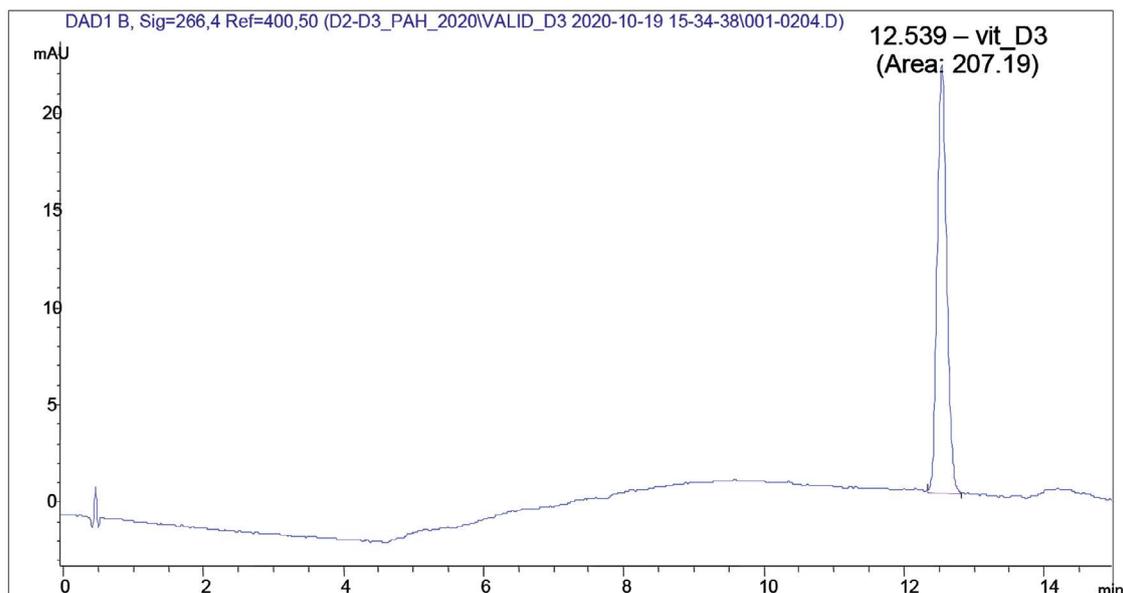


Рисунок 5. Хроматограмма стандартного образца (27,1 нг/мкл)

Figure 5. Chromatogram of a standard sample (27.1 ng/μL)

Угловой коэффициент (b) 7,668
Свободный член (a) -3,3757

Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Линейность».

Правильность

Для проверки правильности разработанной методики использовались опытные образцы, полученные путем внесения в плацебо жидкое (вода очищенная) и плацебо сухое (таблеточная смесь «Аквадетрим», производства ООО «Акрихин»), 5-и различных концентраций субстанции холекальциферола 100 SD/S.

Подготовку опытных образцов проводили согласно разделу «Подготовка проб и растворов».

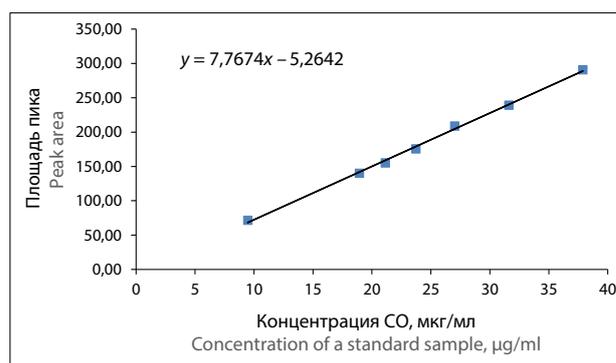


Рисунок 6. Калибровочный график стандартных растворов холекальциферола

Figure 6. Calibration curve of standard cholecalciferol solutions

Таблица 3. Сведения для оценки линейной зависимости площадей пиков от концентраций

Table 3. Information for evaluating the linear dependence of peak areas on concentrations

Содержание, нг Content, ng	Концентрация СО, мкг/мл Concentration of a standard sample, μg/ml	Концентрация СО с учетом чистоты стандарта, мкг/мл Concentration of the standard sample (corrected for the purity of the standard), μg/ml	Площадь пика Peak area				Среднее значение площади пика Average peak area
			S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	
19	9,50	9,47	72,14	71,69	71,89	71,21	71,73
38	19,00	18,94	141,66	137,19	141,22	141,04	140,28
42,4	21,20	21,14	153,03	155,24	156,55	156,50	155,33
47,6	23,80	23,73	176,86	172,69	176,06	176,82	175,61
54,2	27,10	27,02	207,01	209,70	210,63	208,66	209,00
63,4	31,70	31,60	240,42	240,77	238,41	237,23	239,21
76	38,00	37,89	290,49	296,44	291,21	285,10	290,81

Подготовку опытных образцов проводили следующим образом: в мерные колбы вместимостью 10 мл помещали около 1,0 г плацебо (смесь всех компонентов, кроме витамина D₃, предоставленная заказчиком, и воды очищенной в качестве жидкого плацебо), добавляли разные навески субстанции холекальциферола 100 SD/S, затем добавляли 2 мл воды очищенной, укупоривали колбы, встряхивали на вибрационном шейкере и ставили на водяную баню на 10 мин при температуре не выше 60 °С. Затем прибавляли 5 мл растворителя (метанола), укупоривали и встряхивали на вибрационном шейкере, при необходимости помещали на водяную баню при температуре не выше 60 °С не более чем на 10 мин, и доводили метанолом до метки. Затем перемешивали не менее 20 раз. Полученные растворы анализировали согласно методике анализа. По полученным результатам рассчитывали концентрации холекальциферола в опытных образцах и оценивали смещение данных результатов относительно опорных значений содержания введенного стандарта при помощи таблицы Excel.

По полученным результатам рассчитывали концентрации холекальциферола в опытных образцах и оценивали смещение данных результатов относительно опорных значений содержания введенного стандарта при помощи таблицы Excel.

Анализ проводили в течение 1 рабочего дня одним аналитиком. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины восстановления и средний процент восстановления.

Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Правильность»: математическое ожидание содержания добавленного

в образцы стандарта холекальциферола, принятое в относительных единицах за 100 %, не выходит за пределы доверительных интервалов среднего значения восстановления (96,96; 101,56) (таблица 4).

Таблица 4. Результаты оценки правильности на плацебо сухом (пример типичной хроматограммы представлен на рисунке 7)

Table 4. The results of calculating the accuracy on placebo dry (an example of a typical chromatogram is shown in Figure 7)

Количество результатов Number of results	15
Среднее значение Z, % Mean Z, %	99,26
Дисперсия (S ²) Dispersion (S ²)	17,15
Среднее квадратичное отклонение (СКО, σ) Mean square deviation (СКО, σ)	4,14
Число степеней свободы, f Number of degrees of freedom, f	2,15
Критическое значение t-критерия Стьюдента для P = 0,95 The critical value of the Student's t-test for P = 0.95	14
Коэффициент вариации (CV, %) The coefficient of variation (CV, %)	4,17
Стандартная ошибка среднего (SEM) Standard error of the mean (SEM)	1,07
Доверительный интервал (±ΔZ), % Confidence interval (±ΔZ), %	2,30
Нижняя граница доверительного интервала, % Lower limit of the confidence interval, %	96,96
Верхняя граница доверительного интервала, % Upper limit of the confidence interval, %	101,56

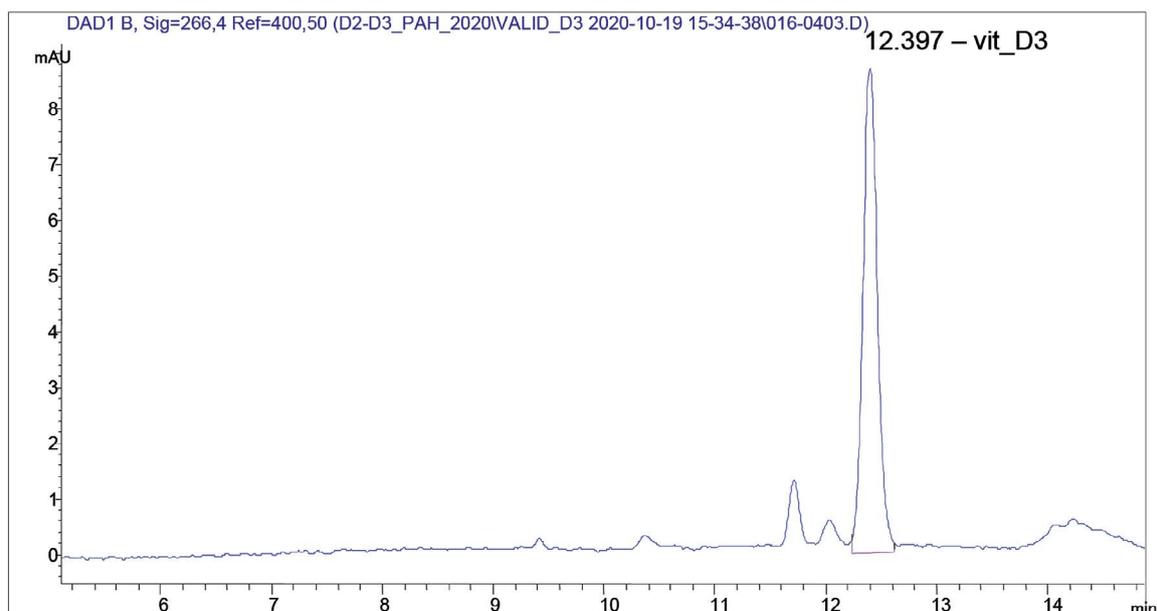


Рисунок 7. Хроматограмма сухого плацебо с добавкой субстанции холекальциферола 100 SD/S

Figure 7. Chromatogram of dry placebo with added cholecalciferol substance 100 SD/S

Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Правильность»: математическое ожидание содержания добавленного в образцы стандарта холекальциферола, принятое в относительных единицах за 100 %, не выходит за пределы доверительных интервалов среднего значения восстановления (99,07; 100,87) (таблица 5).

Таблица 5. Результаты оценки правильности на плацебо жидком (пример типичной хроматограммы представлен на рисунке 8)

Table 5. Results of calculating the accuracy on placebo liquid (an example of a typical chromatogram is shown in Figure 8)

Количество результатов Number of results	15
Среднее значение Z, % Mean Z, %	99,97
Дисперсия (S^2) Dispersion (S^2)	2,63
Среднее квадратичное отклонение (СКО, σ) Mean square deviation (СКО, σ)	1,62
Число степеней свободы, f Number of degrees of freedom, f	14
Критическое значение t-критерия Стьюдента для $P = 0,95$ The critical value of the Student's t-test for $P = 0.95$	2,15
Коэффициент вариации (CV, %) The coefficient of variation (CV, %)	1,62
Стандартная ошибка среднего (SEM) Standard error of the mean (SEM)	0,42
Доверительный интервал ($\pm\Delta Z$), % Confidence interval ($\pm\Delta Z$), %	0,90
Нижняя граница доверительного интервала, % Lower limit of the confidence interval, %	99,07
Верхняя граница доверительного интервала, % Upper limit of the confidence interval, %	100,87

Диапазон применения

В соответствии с полученными данными валидируемая методика обеспечивает правильность результатов и линейную зависимость аналитического сигнала от концентрации растворов, как минимум, в интервале от 0,0095 ÷ 0,038 мг/мл. Данный интервал является диапазоном применения методики по результатам валидации.

Прецизионность

Прецизионность методики оценивали согласно РМГ 61-2010 в условиях сходимости (повторяемости), т. е. при выполнении анализа одним химиком в течение короткого промежутка времени на одном и том же оборудовании, а также в условиях внутрिलाбораторной прецизионности при выполнении анализа образца той же серии препарата во второй день. В обоих случаях было проанализировано по шесть однородных и стабильных по составу проб препарата.

Сходимость

Определение проводили на 6 испытуемых растворах для каждого ЛП («Аквадетрим», таблетки растворимые и «Аквадетрим», раствор). 6 испытуемых растворов обоих ЛП («Аквадетрим», таблетки растворимые и «Аквадетрим», раствор) подготавливались по методике, описанной выше. Каждый раствор хроматографировали 3 раза, стандартный раствор холекальциферола хроматографировали 5 раз.

Анализ проводили в течение 1 рабочего дня одним аналитиком. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины среднего арифметического и дисперсии результатов (таблицы 6 и 7).

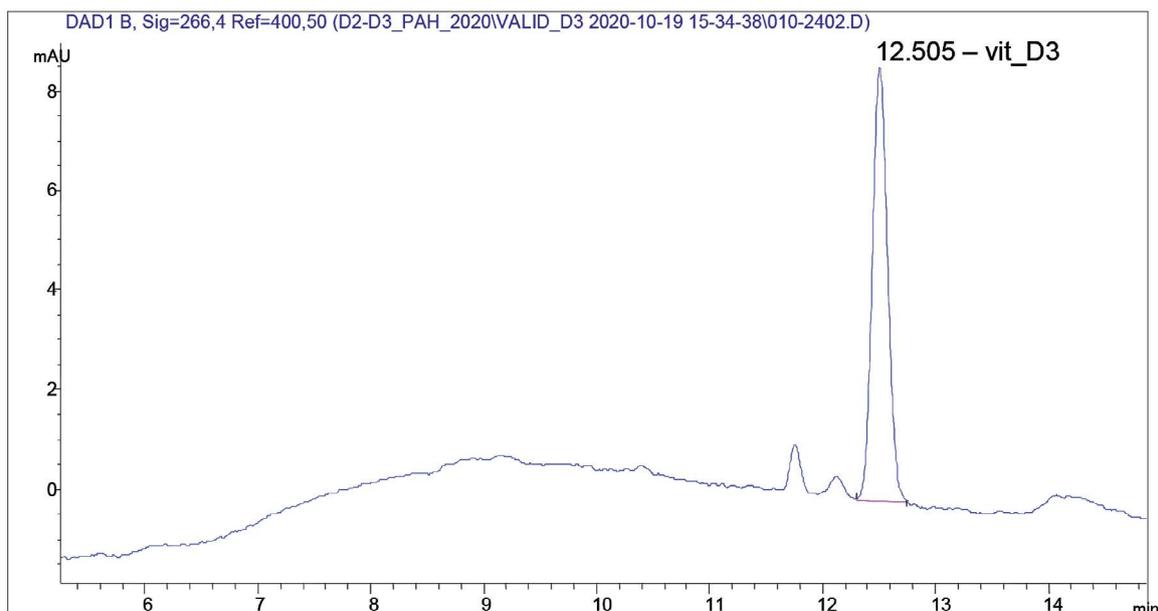


Рисунок 8. Хроматограмма жидкого плацебо с добавкой субстанции холекальциферола 100 SD/S

Figure 8. Chromatogram of liquid placebo with added cholecalciferol substance 100 SD/S

Таблица 6. Результаты оценки сходимости для холекальциферола в ЛП «Аквадетрим», таблетки растворимые

Table 6. The results of calculating the precision for cholecalciferol in the drug "Akvadetrim" soluble tablets

Код образца Samplecode	Навеска, мг Weighed amount, mg	Площадь пика Peak area	Обнаружено, мкг/г Found, µg/g	Среднее по образцам \bar{x} , мкг/г Average content for samples \bar{x} , µg/g	Дисперсия результатов, S ² Dispersion of results, S ²
AT-1 AS-1	907,7	105,1	151,4	150,7	0,52
	907,7	104,1	150,0		
	907,7	104,6	150,7		
AT-2 AS-2	653,4	76,74	153,6	155,2	6,37
	653,4	76,9	153,9		
	653,4	79	158,1		
AT-3 AS-3	798	92,74	152,0	150,3	2,32
	798	91,3	149,6		
	798	91	149,1		
AT-4 AS-4	717,2	82,67	150,8	150,1	0,75
	717,2	81,76	149,1		
	717,2	82,46	150,4		
AT-5 AS-5	793	97,9	161,5	159,2	9,43
	793	94,4	155,7		
	793	97,25	160,4		
AT-6 AS-6	967	100,5	135,9	134,6	1,51
	967	99,4	134,4		
	967	98,7	133,5		

В соответствии с п. 5.2.1 РМГ 61 рассчитано среднее арифметическое и дисперсии результатов единичного анализа, полученных в условиях повторяемости. Однородность распределения дисперсий оценена с применением критерия Кохрена. Расчетное значение критерия не превысило его критической границы для доверительной вероятности $P = 0,95$ и числа степеней свободы $f = 17$.

Однородность распределения дисперсий оценена с применением критерия Кохрена. Расчетное значение критерия не превысило его критической границы для доверительной вероятности $P = 0,95$ и числа степеней свободы $f = 17$.

Таким образом, расхождение между двумя параллельными определениями, полученными по методике, не должно превышать в 19 случаях из 20:

- 3,46 % для твердых лекарственных форм,
- 2,74 % для жидких лекарственных форм.

Внутрилабораторная прецизионность

Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам определения холекальциферола тех же образцов, по которым проводилась оценка повторяемости («Аквадетрим», таблетки растворимые и «Ак-

вадетрим», раствор) в другой день, по 6 навесок каждого ЛП. Содержание холекальциферола в ЛП «Аквадетрим», таблетки растворимые, составила 156 мкг/1 г (12,5 мкг/табл.); в ЛП «Аквадетрим», раствор – 375 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 3 раза, стандартный раствор холекальциферола хроматографировали 5 раз.

Таблица 7. Результаты оценки сходимости для холекальциферола в ЛП «Аквадетрим», раствор

Table 7. The results of calculating the precision for cholecalciferol in the drug "Akvadetrim" solution

Код образца Samplecode	Навеска, мг Weighed amount, mg	Площадь пика Peak area	Обнаружено, мкг/г Found, µg/g	Среднее по образцам \bar{x} , мкг/г Average content for samples \bar{x} , µg/g	Дисперсия результатов, S ² Dispersion of results, S ²
АЖ-1 AL-1	400,5	117,85	384,8	392,0	46,4
	400,5	122	398,4		
	400,5	120,3	392,8		
АЖ-2 AL-1	439,8	130,44	387,9	387,4	1,6
	439,8	130,6	388,4		
	439,8	129,8	386,0		
АЖ-3 AL-3	501,2	139,2	363,2	367,2	13,0
	501,2	141,05	368,1		
	501,2	141,9	370,3		
АЖ-4 AL-4	509,2	140,96	362,1	363,4	9,8
	509,2	142,87	367,0		
	509,2	140,6	361,1		
АЖ-5 AL-5	458,8	131,83	375,8	377,6	6,4
	458,8	132,1	376,6		
	458,8	133,48	380,5		
АЖ-6 AL-6	423,4	124	383,0	380,6	6,1
	423,4	122,4	378,1		
	423,4	123,2	380,6		

Для полученных значений концентраций были рассчитаны средние арифметические отдельных определений, полученные одним химиком в разные дни.

В соответствии с п. 5.2.2.1 РМГ 61 была проведена проверка средних значений отдельных определений на наличие выбросов по критерию Граббса. В результате из дальнейших расчетов были отброшены средние значения определения образцов АТ-2 и АТ-5 первого дня определения.

По неотброшенным результатам рассчитано выборочное СКО результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности:

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^L (X_j - \bar{X})^2}{L-1} + \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{N}\right) \cdot \sigma_r^2} = 8,06,$$

где N – число образцов, участвовавших в оценке прецизионности.

Относительное СКО внутрилабораторной прецизионности составило:

$$\sigma_{R,\%} = 5,4 \%$$

Показатель внутрилабораторной прецизионности методики в виде предела воспроизводимости R рассчитывался по формуле:

$$R = Q(P, n) \sigma_R = 22,3,$$

$$R_{\%} = 15,0 \%$$

В результате оценки по критерию Граббса из дальнейших расчетов было отброшено среднее значение определения образца АЖ-1 первого дня определения.

По неотброшенным результатам рассчитано выборочное СКО результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности:

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (X_l - \bar{X})^2}{L-1} + \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{N}\right) \cdot \sigma_r^2} = 10,9.$$

Относительное СКО внутрилабораторной прецизионности составило:

$$\sigma_{R,\%} = 2,9 \%$$

Показатель внутрилабораторной прецизионности методики в виде предела воспроизводимости R рассчитывался по формуле:

$$R = Q(P, n) \sigma_R = 30,3,$$

$$R_{\%} = 8,0 \%$$

Таким образом, расхождение между средними результатами двух серий определений, выполненных по методике в условиях внутрилабораторной прецизионности, не должно превышать в 19 случаях из 20:

- 15,0 % для твердых лекарственных форм;
- 8,0 % для жидких лекарственных форм.

Разработанная и валидированная методика была применена для анализа следующих лекарственных форм (лекарственные средства и биологические активные добавки):

Лекарственные средства:

1. «Аквадетрим» водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023, серия № 050420).
2. «Аквадетрим» таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022, серия № 170420).

Биологически активные добавки:

1. «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022, серия № 1913870002).

2. «Детримакс 1000 МЕ» таблетки, производства «Игл Нутришиналс Инк» (годен до 02.2022, серия № WJ141)

3. «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023, серия № 260220)

Исследование всех образцов было проведено в рамках одного аналитического цикла, что позволяет снизить внутрилабораторную вариабельность результатов исследования. Пригодность хроматографической системы соответствовала нормам. На хроматограммах как твердых лекарственных форм, так и жидких отсутствовали interfering пики, мешающие анализу. Таким образом, результаты исследования могут быть признаны достоверными в рамках установленных валидационных характеристик.

Результаты анализа обобщены в таблице 8, нормированы по показателю содержания мкг/г для твердых лекарственных форм и мкг/мл для жидких лекарственных форм. Для жидких лекарственных форм производился с учетом поправки на плотность («Аквадетрим» водный раствор – 1 г/мл)

Погрешность метода рассчитана по формуле:

$$\Delta = 1,96 \cdot \text{СКО},$$

где СКО – среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности (СКО для жидких форм составило 2,9 %, СКО для сухих форм составило 5,8 %). Соответственно, погрешность метода для жидких форм (водных растворов) составила $\pm 5,68 \%$, для сухих лекарственных форм $\pm 11,37 \%$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика определения показателя «Содержание витамина D_3 (холекальциферола)» в витаминных лекарственных формах методом ВЭЖХ. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, правильность, линейность, диапазон применения, прецизионность. Показано, что результаты валидации удовлетворительны по всем указанным критериям. Диапазон применения методики 9,5–38 мкг/мл.

Результаты валидации методики и исследования реальных образцов показали, что данная методика может быть использована для определения витамина D_3 в витаминных лекарственных препаратах на основе водорастворимых субстанций витамина D_3 , в виде водных растворов и растворов триглицеридов жирных кислот.

По результатам количественного определения было установлено, что:

1. Для лекарственного средства «Аквадетрим», водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023 г., серия № 050420),

Таблица 8. Результаты количественного определения витамина D₃ (холекальциферола) в лекарственных формах (лекарственные средства и биологические активные добавки)

Table 8. Results of quantitative determination of vitamin D₃ (cholecalciferol) in dosage forms (drugs and dietary supplements)

Наименование препарата Drugname	Содержание D ₃ в препарате (заявленное) Vitamin D ₃ content in the drug (declared)	Содержание D ₃ в 1 г (1 мл) препарата (заявленное) Vitamin D ₃ content in 1 g (1 ml) of the drug (declared)	Содержание D ₃ в 1 г препарата (фактическое) Vitamin D ₃ content in 1 g (1 ml) of the drug (found)	Отклонение (факт/заявленное), % Deviation (found/ declared), %
«Ультра-Д» Ultra-D	25 мкг/табл. (масса табл. 425 мг) 25 µg/tablet (tablet weight 425 mg)	58,8 мкг/г 58.8 µg/g	52,6 мкг/г 52.6 µg/g	-10,5
«Детримакс 1000 МЕ» Detrimax 1000 IU	25 мкг/табл. 25 µg/tablet	108,7 мкг/1 г 108.7 µg/1 g	106,1 мкг/г 106.1 µg/g	-2,4
«Детримакс 2000 МЕ» Detrimax 2000 IU	50 мкг/табл. 50 µg/tablet	208,3 мкг/1 г 208.3 µg/1 g	202,4 мкг/г 202.4 µg/g	-2,8
«Аквадетрим», водный раствор "Aquadetrim" aqueous solution	15 000 МЕ/мл; 1 капля (33,3 мкл) = = 500 МЕ (12,5 мкг/33,3 мкл) 375 мкг/мл 15,000 IU / ml; 1 drop (33.3 µl) = = 500 IU (12.5 µg/33.3 µl) 375 µg/ml	375 мкг/мл 375 µg/ml	370 мкг/мл 370 µg/ml	-1,3
«Аквадетрим», таблетки водорастворимые "Aquadetrim" water-soluble tablets	500 МЕ/табл. (12,5 мкг/табл.) 500 IU/tablet (12.5 µg/tablet)	156 мкг/1 г 156 µg/1 g	155 мкг/г 155 µg/g	-0,6

фактическое содержание витамина D₃ составило 370 мкг/мл, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило -1,3 %.

- Для лекарственного средства «Аквадетрим», таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022 г., серия № 170420), фактическое содержание витамина D₃ составило 155 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило -0,6 %.
- Для биологически активной добавки «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022 г., серия № 1913870002), фактическое содержание витамина D₃ составило 58,8 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило -10,5 %.
- Для биологически активной добавки «Детримакс 1000 МЕ», таблетки, производства «Игл Нутришнэл Инк» (годен до 02.2022 г., серия № WJ141), фактическое содержание витамина D₃ составило 106,1 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило -2,4 %.
- Для биологически активной добавки «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023 г., серия № 260220), фактическое содержание витамина D₃ составило 202,4 мкг/г, при этом отклонение фактического

содержания от заявленного на этикетке составило -2,8 %.

В результате проведенных исследований было показано, что для определения витамина D₃, используемого в виде водорастворимой субстанции, в лекарственных препаратах и БАД к пище возможно использование методик без проведения стадии омыления. Это дает ощутимые преимущества, так как позволяет избежать потерь действующего вещества в процессе многостадийной подготовки проб, ведь витамин D₃ нестабилен на свету и в среде, богатой кислородом.

ЛИТЕРАТУРА

- Thomson B. M., Cressey P. J. Determination of vitamin D in foods: Current knowledge and data gaps. Wellington: Ministry for Primary Industries; 2014. 39 p.
- Mahmoodani F., Perera C. O., Fedrizzi B., Abernethy G., Chen H. Degradation studies of cholecalciferol (vitamin D3) using HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization. *Food Chemistry*. 2017;219:373–381. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.146.
- Вильмс Е. А., Добровольская Е. В., Турчанинов Д. В., Быкова Е. А., Сохошко И. А. Обеспеченность взрослого населения Западной Сибири витамином D: данные популяционно-го исследования. *Вопросы питания*. 2019;88(4):75–82. DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10044.
- Winuprasith T., Khomein P., Mitbumrung W., Suphantharika M., Nitithamyong A., McClements D. J. Encapsulation of vitamin D3 in pickering emulsions stabilized by nanofibrillated mangosteen cellulose: Impact on in vitro digestion and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*. 2018;83:153–164. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.04.047.

5. Гаммель И. В., Суворова О. В., Запорожская Л. И. Анализ тенденций российского рынка биологически активных добавок к пище. *Медицинский альманах*. 2017;6(51):154–158.
6. Perales S., Alegria A., Barberá R., Farré R. Review: Determination of vitamin D in dairy products by high performance liquid chromatography. *Food Science and Technology International*. 2005;11(6):451–462. DOI: 10.1177/1082013205060129.
7. Agilent Technologies 5990-8627 EN LC/MS/MS Determination of vitamin D in food. Available at: www.agilent.com/chem/QQQ. Accessed: 12.05.2021.
8. Afrozul H., Jaishen R., Laila O. A.-W., Dhahi A.. Routine HPLC Analysis of vitamin D3 and D2. *Chromsystems*. Available at: www.chromsystems.de. Accessed: 12.05.2021.
9. ГОСТ 32043-2012 Премиксы. Методы определения витаминов А, D, Е. Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200104849/titles/353F5U8>. Ссылка активна на 12.05.2021.
10. Эпштейн Н. А. Проверка пригодности хроматографической системы: влияние поправочных коэффициентов и поздно выходящих пиков примесей на требование к отношению сигнал/шум. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):108–112. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-108-112.
11. Суханова А. М., Перова И. Б., Эллер К. И., Родионова Г. М., Чернова С. В., Кузина В. Н. Разработка и валидация методики количественного определения сибутрамина в составе лекарственных препаратов методом КЭ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):141–145. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-141-145.
12. Эпштейн Н. А. Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):129–136. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136.
13. Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
8. Afrozul H., Jaishen R., Laila O. A.-W., Dhahi A.. Routine HPLC Analysis of vitamin D3 and D2. *Chromsystems*. Available at: www.chromsystems.de. Accessed: 12.05.2021.
9. GOST 32043-2012 Premiksy. Metody opredeleniya vitaminov A, D, E [GOST 32043-2012 Premixes. Methods for the determination of vitamins A, D, E]. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/1200104849/titles/353F5U8>. Accessed: 12.05.2021. (In Russ.)
10. Epshtein N. A. Chromatographic system suitability testing: influence of correction factors and late eluting peaks of impurities on the requirement for the signal-to-noise ratio. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(1):108–112. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-108-112.
11. Sukhanova A. M., Perova I. B., Eller K. I., Rodionova G. M., Chernova S. V., Kuzina V. N. Development and Validation of Sibutramine Determination in Drug Products by Capillary Electrophoresis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):141–145. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-141-145.
12. Epshtein N. A. Validation of Chromatographic Methods: Checking the Peak Purity and the Specificity of Methods with Diode Array Detectors. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):129–136. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136.
13. Epshtein N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphical and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.

REFERENCES

1. Thomson B. M., Cressey P. J. Determination of vitamin D in foods: Current knowledge and data gaps. Wellington: Ministry for Primary Industries; 2014. 39 p.
2. Mahmoodani F., Perera C. O., Fedrizzi B., Abernethy G., Chen H. Degradation studies of cholecalciferol (vitamin D3) using HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization. *Food Chemistry*. 2017;219:373–381. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.146.
3. Vilms E. A., Dobrovolskaya E. V., Turchaninov D. V., Bykova E. A., Sokhoshko I. A. Provision of vitamin D in the adult population of Western Siberia: a population-based study. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2019;88(4):75–82. (In Russ.) DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10044.
4. Winuprasith T., Khomein P., Mitbumrung W., Suphantharika M., Nitithamyong A., McClements D. J. Encapsulation of vitamin D3 in pickering emulsions stabilized by nanofibrillated mangosteen cellulose: Impact on in vitro digestion and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*. 2018;83:153–164. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.04.047.
5. Gammel I. V., Suvorova O. V., Zaporozhskaya L. I. Analiz tendentsiy rossiyskogo rynka biologicheskii aktivnykh dobavok k pishche [Analysis of trends in the Russian market of biologically active food additives]. *Meditinskiy al'manakh = Medical Almanac*. 2017;6(51):154–158. (In Russ.)
6. Perales S., Alegria A., Barberá R., Farré R. Review: Determination of vitamin D in dairy products by high performance liquid chromatography. *Food Science and Technology International*. 2005;11(6):451–462. DOI: 10.1177/1082013205060129.
7. Agilent Technologies 5990-8627 EN LC/MS/MS Determination of vitamin D in food. Available at: www.agilent.com/chem/QQQ. Accessed: 12.05.2021.