

Анализ фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ

А. С. Алексеева^{1*}, М. В. Гаврилин³, Т. Б. Шемерянкина¹, М. С. Смирнова¹,
Е. П. Федорова¹, Т. М. Каргина¹, О. О. Новиков², С. А. Ковалева², Н. Н. Бойко²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский университет дружбы народов»,
Миклухо-Маклая ул., д. 6, Москва, 117198, Российская Федерация

³ Общество с ограниченной ответственностью «Фармакор Продакшн»,
Репищева ул., д. 14, Санкт-Петербург, 197378, Российская Федерация

Резюме. Поливитаминные препараты, содержащие фолиевую кислоту, значительно различаются по своему составу. Предлагаемые производителями методы и условия анализа фолиевой кислоты также различаются, в связи с чем необходима унификация методик анализа фолиевой кислоты для близких по составу препаратов. **Цель работы:** сравнение результатов апробации методик анализа фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в изократическом режиме подачи подвижной фазы. **Материалы и методы:** хроматограф жидкостный Agilent 1260 Infinity II LC с диодно-матричным детектором, аналитическая длина волны 280 нм. Колонки хроматографические с неподвижной фазой на основе силикагеля с привитыми группами C8 и C18. Режим подачи подвижной фазы — изократический. Модельные смеси, содержащие фолиевую кислоту, цианокобаламин, железа сульфат и калия йодид. **Результаты:** наименьшие значения относительного стандартного отклонения площади пика фолиевой кислоты ($RSD = 0,09\%$) и фактора асимметрии пика ($A_s = 1,04$) отмечены при анализе модельной смеси «железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин» на колонке 250×4,0 мм с силикагелем октилсилильным (C8) эндкепированным с использованием в качестве подвижной фазы смеси метанол — фосфатный буферный раствор pH 6,6 (12:88) при температуре 25 °С. Показана возможность одновременного определения примеси птероевой кислоты в данных условиях анализа и осаждения мешающих ионов железа при использовании в качестве растворителя пробы раствора, содержащего этилендиаминтетрауксусную кислоту, с pH 9,5. **Выводы:** при выборе оптимальной унифицированной методики анализа фолиевой кислоты в комплексных препаратах можно рекомендовать метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для проверки пригодности хроматографической системы рекомендуется использовать раствор, содержащий фолиевую и птероевую кислоты.

Ключевые слова: фолиевая кислота; ВЭЖХ; поливитаминные препараты; фактор асимметрии; относительное стандартное отклонение; эффективность хроматографической колонки

Для цитирования: Алексеева АС, Гаврилин МВ, Шемерянкина ТБ, Смирнова МС, Федорова ЕП, Каргина ТМ, Новиков ОО, Ковалева СА, Бойко НН. Анализ фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(3):185–192. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-185-192>

* Контактное лицо: Алексеева Анастасия Сергеевна; AlekseevaAS@expmed.ru

Determination of Folic Acid in Multivitamin Preparations by Reversed Phase HPLC

A. S. Alekseeva^{1*}, M. V. Gavrilin³, T. B. Shemeryankina¹, M. S. Smirnova¹, E. P. Fedorova¹,
T. M. Kargina¹, O. O. Novikov², S. A. Kovaleva², N. N. Boyko²

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² Peoples' Friendship University of Russia
6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russian Federation

³ "Pharmacor Production", Ltd.,
14 Repishcheva St., St.-Petersburg 197378, Russian Federation

Abstract. A great variety of components in multivitamin preparations containing folic acid, and a variety of test methods and conditions of folic acid determination proposed by manufacturers, require alignment of test procedures for products with similar composition. **The aim of the study** was to compare the results of experimental verification of folic acid determination procedures which use reversed phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC) with isocratic elution mode. **Materials and methods:** The Agilent 1260 Infinity II LC system with a diode array detector (280 nm), isocratic elution mode, C8- and C18-bonded silica gel chromatographic columns, model mixtures containing folic acid, cyanocobalamin, ferrous sulfate, and potassium iodide, were used in the study. **Results:** The lowest relative standard deviation of the folic acid peak area ($RSD=0.09\%$), and the lowest

asymmetry factor ($A_s=1.04$) for folic acid were observed for the model mixture “ferrous sulfate+folic acid+cyanocobalamin” and the following test conditions. Column: 250×4.0 mm, silica gel for chromatography, octylsilyl (C8), endcapped; mobile phase: methanol–phosphate buffer (12:88), pH 6.6; column temperature: 25 °C. The study demonstrated the feasibility of using these conditions for determination of pteric acid impurity with simultaneous precipitation of interfering ferrous ions, using ethylenediaminetetraacetic acid solution, pH 9.5, as a solvent. **Conclusions:** RP HPLC can be recommended as an optimal aligned test procedure for determination of folic acid in combination products. It is recommended to use a solution containing folic and pteric acids for system suitability testing.

Key words: folic acid; HPLC; multivitamin preparations; asymmetry factor; relative standard deviation; column efficiency

For citation: Alekseeva AS, Gavrilin MV, Shemeryankina TB, Smirnova MS, Fedorova EP, Kargina TM, Novikov OO, Kovalova SA, Boyko NN. Determination of folic acid in multivitamin preparations by reversed phase HPLC. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(3):185–192. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-185-192>

* **Corresponding author:** Anastasia S. Alekseeva; AlekseevaAS@expmed.ru

Разработка и совершенствование методов определения витаминов является актуальной задачей, от решения которой зависит качество и безопасность фармацевтической продукции [1].

Фолиевая кислота является водорастворимым витамином, который участвует в ряде ключевых клеточных процессов, в частности синтезе пиримидина, нуклеопротеинов, в регуляции активности генов, является кофактором метаболизма гомоцистеина, повышение уровня которого связано с рисками возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, прогрессированием хронических болезней почек, тяжелой формы прогрессирующего атеросклероза [2, 3]. Исследования показали, что высокое потребление фолатов с пищей ведет к повышению риска развития колоректальных аденом [4, 5]. Фолаты играют важную роль в предупреждении формирования дефектов нервной трубки у эмбриона [6], также фолиевая кислота используется в терапии и диагностике некоторых онкологических заболеваний, включая опухоли легких и яичников [7, 8].

Фолиевая кислота входит в состав 44 поливитаминных препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации. Среди лекарственных форм, представленных на отечественном рынке, содержащих фолиевую кислоту, наиболее распространенными являются таблетки, покрытые пленочной оболочкой (14 наименований), таблетки, покрытые оболочкой (10). Также фолиевая кислота в поливитаминных препаратах присутствует в виде таблеток жевательных (9), капсул (5), таблеток (2), драже, сиропа, лиофилизата для приготовления раствора для инфузий и лиофилизата для приготовления раствора для внутривенного введения (по 1 наименованию).

При выборе методики для анализа фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах следует учитывать физико-химические свойства этого вещества и его нестабильность [9]. В воде фолиевая кислота практически нерастворима, в кислых и щелочных растворах растворима, в органических растворителях нерастворима. В щелочной среде ее стабильность выше, чем в кислой, поэтому стандартные образцы производных фолиевой кислоты принято использовать в виде щелочных растворов [9].

Фолиевая кислота в водном растворе ведет себя как слабая кислота. В диапазоне pH от 4 до 12 структура молекулы находится в равновесии между амидом (кислотная форма) и фенолятом (основная форма). А. Thomas и соавт. в 2002 г. было отмечено, что кислотно-щелочной баланс соединений птерина, таких как фолиевая кислота, смещается (>99%) при pH 4,9–5,5 в сторону образования кислотной формы, а при pH 10,0–10,5 в сторону образования основной формы. В кислой среде под действием света и высокой температуры фолиевая кислота подвергается деградации. Термоустойчивость фолатов значительно варьирует. Так, стабильность тетрагидрофолиевой и 5-метилтетрагидрофолиевой кислот при нагревании значительно повышается при добавлении аскорбиновой кислоты [3, 9]. Авторами работы [3] проанализированы результаты исследований стабильности фолиевой кислоты. Указано, что в 1951 г. А. Biamonte и G. Schneller описали стабильность фолиевой кислоты в растворах, содержащих одно или несколько соединений из витаминов группы В, при pH от 3 до 7. Два десятилетия спустя, в 1975 г., J. O'Broin и соавт. описали стабильность фолиевой кислоты в различных буферных системах, установили период полураспада при разложении фолиевой кислоты при pH 5 или выше при температуре окружающей среды и обнаружили, что период полураспада составляет более 700 ч, однако резко снижается до 24–64 ч при значениях pH ниже 4. Тогда же было отмечено, что разложение фолиевой кислоты при pH 6 и 8 значительно снижалось при использовании фосфатного буферного раствора, но не других буферных композиций (цит. по [3]).

Выбор метода анализа для определения водорастворимых витаминов обусловлен рядом требований: пределом обнаружения метода в зависимости от содержания определяемых компонентов, допускаемой погрешностью, временными затратами, стоимостью анализа. Безусловно, предпочтение отдается методам, требующим минимальной пробоподготовки при максимальной информативности получаемых результатов. Таким требованиям удовлетворяет метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), который является

перспективным для анализа многокомпонентных смесей, содержащих водорастворимые витамины [3, 9, 10].

Методики определения водорастворимых витаминов на основе обращенно-фазовой ВЭЖХ разработаны как для градиентного, так и для изократического режимов хроматографирования. Выполнение анализа при градиентном элюировании требует дополнительного времени для установления равновесия в хроматографической системе при повторном анализе. При разделении смесей большого количества водорастворимых витаминов оптимальным вариантом, как было показано, является градиентное элюирование [11]. Однако для небольшого количества определяемых компонентов в смеси достаточно использовать изократическое элюирование, что может быть применимо и при разработке методик разделения водорастворимых витаминов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [12]. При анализе научных публикаций было выявлено, что для определения фолиевой кислоты могут применяться колонки Spherisorb ODS (250×4,6 мм, 5 мкм), Hypersil ODS (150×4,6 мм, 3 мкм) [13], Microsorb-MV C18 (150×4,6 мм, 3 мкм) [14] при температуре 25 °C [14] или 30 °C [13]. Диапазон длин волн, при которых проводилось обнаружение фолиевой кислоты, — 280–290 нм [13, 14]. В качестве подвижной фазы использовалась смесь 24% водного раствора метанола (об./об.) и буферного раствора (3,5 мМ калия дигидрофосфата и 3,2 мМ дикалия гидрофосфата), pH 6,8, содержащего 5 мМ дигидрофосфата тетрабутиламмония в качестве ион-парного агента [14].

Цель работы — сравнение результатов апробации методик анализа фолиевой кислоты в поливитаминных препаратах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в изократическом режиме подачи подвижной фазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были методики анализа, применяемые для контроля качества лекарственных средств, содержащих фолиевую кислоту. Для сравнения этих методик были проанализированы модельные смеси, соответствующие по составу поливитаминным лекарственным препаратам, зарегистрированным в Российской Федерации. Смеси содержали фармацевтические субстанции фолиевой кислоты (Sigma-Aldrich кат. № 1286005) (от 0,4 до 5 мг), цианокобаламина (Sigma-Aldrich кат. № C3000000) (от 2 до 10 мкг), железа сульфата (Sigma-Aldrich кат. № F7002) в количестве 112,6 мкг и калия йодида (Sigma-Aldrich кат. № 207969 ReagentPlus®) в количестве 262 мг.

Для проведения анализа модельных смесей использовали:

– хроматограф жидкостный Agilent 1260 Infinity II LC (Agilent Technologies) с диодно-матричным детектором, аналитическая длина волны 280 нм, режим подачи подвижной фазы — изократический. Используемое оборудование было надлежащим образом квалифицировано [15];

– хроматографические колонки:

1) 250×4,6 мм, силикагель октадецилсилильный (C18) деактивированный по отношению к основаниям, для хроматографии, размер частиц 5 мкм, размер пор 130 Å;

2) 250×4,0 мм, силикагель октилсилильный (C8) эндкепированный, для хроматографии, размер частиц 5 мкм, размер пор 100 Å;

3) 150×4,6 мм, силикагель октадецилсилильный (C18) эндкепированный, для хроматографии, размер частиц 5 мкм, размер пор 100 Å;

– стандартный образец фолиевой кислоты USP, чистота 98,9% (Sigma-Aldrich кат. № 1286005). Стандартный образец птероевой кислоты (примесь D фолиевой кислоты) (Sigma-Aldrich кат. № Y0001243);

– метанол и ацетонитрил квалификации для ВЭЖХ. Калия дигидрофосфат, натрия гидроксид и ортофосфорная кислота концентрированная квалификации х.ч.;

– фосфатный буферный раствор pH 6,0 ± 0,6, содержащий калия дигидрофосфат 13,6 г/л.

Условия определения фолиевой кислоты в анализируемых композициях поливитаминных препаратов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ при изократической подаче подвижной фазы представлены в таблице 1.

В качестве критериев пригодности хроматографической системы использовали следующие параметры: фактор асимметрии пика фолиевой кислоты (A_s) не менее 0,80, но не более 1,50; относительное стандартное отклонение площади пика (RSD) не более 2,0%; число теоретических тарелок (N) не менее 1000; время удерживания вещества.

Статистическую обработку результатов анализа проводили согласно ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»¹. Анализировали по две навески смесей в 6 повторностях каждую.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты апробации условий анализа фолиевой кислоты на модельных смесях представлены на рисунках 1–7.

Параллельно с модельными смесями были проанализированы растворы стандартного образца фолиевой кислоты и стандартного образца птероевой кислоты, которые являлись одновременно растворами для проверки пригодности хроматографической системы (рис. 2, 5, 7). Предусмотренное

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Таблица 1. Условия определения фолиевой кислоты в анализируемых композициях поливитаминных препаратов

Table 1. Test conditions for determination of folic acid in multivitamin preparations

Параметры методики Parameter	Условия анализа модельных смесей следующего состава: Test conditions for the model mixtures with the following composition:		
	Калия йодид+фолиевая кислота+цианокобаламин Potassium iodide+Folic acid+Cyanocobalamin	Железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин Ferrous sulfate+Folic acid+Cyanocobalamin	Фолиевая кислота+цианокобаламин Folic acid+Cyanocobalamin
Подвижная фаза Mobile phase	Ацетонитрил — 0,05 М калия дигидрофосфата буферный раствор (рН 6,0) 5:95 Acetonitrile—0.05 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 6.0), 5:95	Метанол — 0,1 М калия дигидрофосфата буферный раствор (рН 6,6) 12:88 Methanol—0.1 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 6.6), 12:88	Ацетонитрил — 0,05 М калия дигидрофосфата буферный раствор (рН 6,0) 5:95 Acetonitrile—0.05 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 6.0), 5:95
Концентрация фолиевой кислоты в анализируемом растворе Folic acid concentration in the test solution	0,016 мг/мл, ступенчатое разбавление сначала в 0,1 М растворе натрия гидроксида, затем в подвижной фазе 0.016 mg/mL, stepwise dilution in 0.1 M sodium hydroxide and in the mobile phase	0,052 мг/мл, ступенчатое разбавление сначала в растворе этилендиаминтетрауксусной кислоты 0,372% (рН 9,5), затем в подвижной фазе 0.052 mg/mL, stepwise dilution in 0.372% ethylenediaminetetraacetic acid (pH 9.5) and in the mobile phase	0,0176 мг/мл, ступенчатое разбавление сначала в 0,1 М растворе натрия гидроксида, затем в подвижной фазе 0.0176 mg/mL, stepwise dilution in 0.1 M sodium hydroxide and in the mobile phase
Параметры колонки Column parameters	C18 250×4,6 мм, 5 мкм 250×4.6 mm, 5 µm	C8 250×4,0 мм, 5 мкм 250×4.0 mm, 5 µm	C18 150×4,6 мм, 5 мкм 150×4.6 mm, 5 µm
Модификация сорбента Stationary phase	Деактивация по отношению к основаниям Base deactivated	Эндкеппинг Endcapped	Эндкеппинг Endcapped
Объем вводимой пробы, мкл Injection volume, µL	20	10	20
Температура, °С Temperature, °C	25	25	25
Скорость подвижной фазы, мл/мин Flow rate, mL/min	1,0	0,6	1,0
Время анализа, мин Run time, min	5	15	20

в методике анализа для модельной смеси «железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин» использование стандартного образца птероевой кислоты, который прибавляют к раствору стандартного образца фолиевой кислоты (рис. 5), отличает эту методику от двух других. Птероевая кислота является примесью D фармацевтической субстанции фолиевой кислоты и может использоваться как для оценки пригодности хроматографической системы, так и для одновременной оценки примесей в препарате, что позволяет повысить информативность анализа. На эту возможность, безусловно, следует обратить внимание при выборе унифицированной методики для анализа фолиевой кислоты.

На хроматограммах наблюдается, что время удерживания фолиевой кислоты в условиях анализа для модельной смеси «калия йодид+фолиевая кислота+цианокобаламин» (C18 250×4,6 мм, 5 мкм, сорбент деактивированный по отношению к основаниям) составляет 3,4 мин, для модельной смеси «железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин» (C8, 250×4,0 мм, 5 мкм, сорбент эндкепированный

— 9 мин), для модельной смеси «фолиевая кислота+цианокобаламин» (C18, 150×4,6 мм, 5 мкм, сорбент эндкепированный) — 8,07 мин. Вероятно, на время удерживания фолиевой кислоты критическое влияние оказывает тип сорбента хроматографической колонки. Удерживание на колонке с октадецилсилильным силикагелем (C18) в определенной мере больше, чем на колонке с октилсилильным силикагелем (C8). Использование силикагеля, деактивированного по отношению к основаниям, приводит к уменьшению времени удерживания фолиевой кислоты.

Средние значения критериев пригодности хроматографической системы и время удерживания вещества в исследуемых условиях, представлены в таблице 2.

Для всех трех вариантов условий анализа выполняются критерии пригодности хроматографической системы для определения фолиевой кислоты в комплексных поливитаминных препаратах. Наименьшее значение относительного стандартного отклонения площади пика ($RSD = 0,09\%$) и фактора асимметрии пика ($A_s = 1,04$) для фолиевой

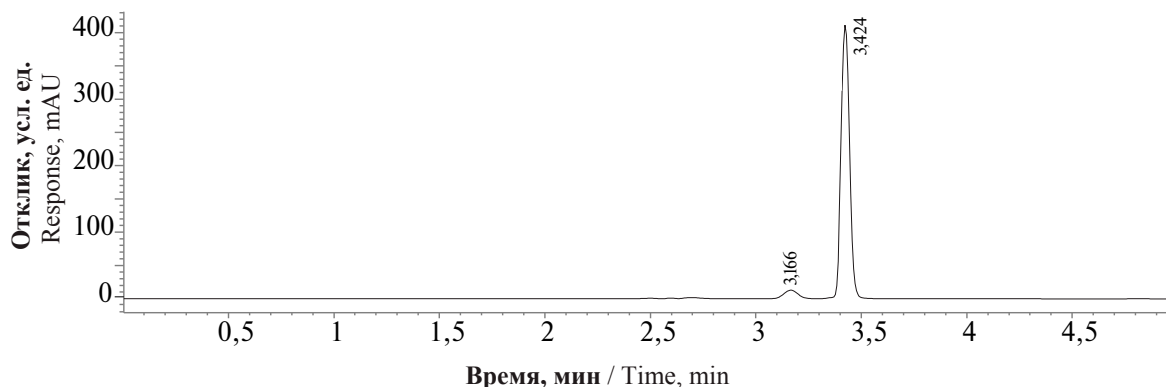


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси «калия йодид+фолиевая кислота+цианокобаламин». Условия анализа: колонка размером 250×4,6 мм, силикагель октадецилсилильный (C18) деактивированный по отношению к основаниям, 5 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил — 0,05 М KH_2PO_4 (5:95); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 3,4 мин.

Fig. 1. Chromatogram of the model mixture “Potassium iodide+Folic acid+Цианокобаламин”. Column: 250×4.6 mm, silica gel for chromatography, octadecylsilyl (C18), base-deactivated, 5 μm . Mobile phase: acetonitrile–0.05 M KH_2PO_4 (5:95). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 3.4 min.

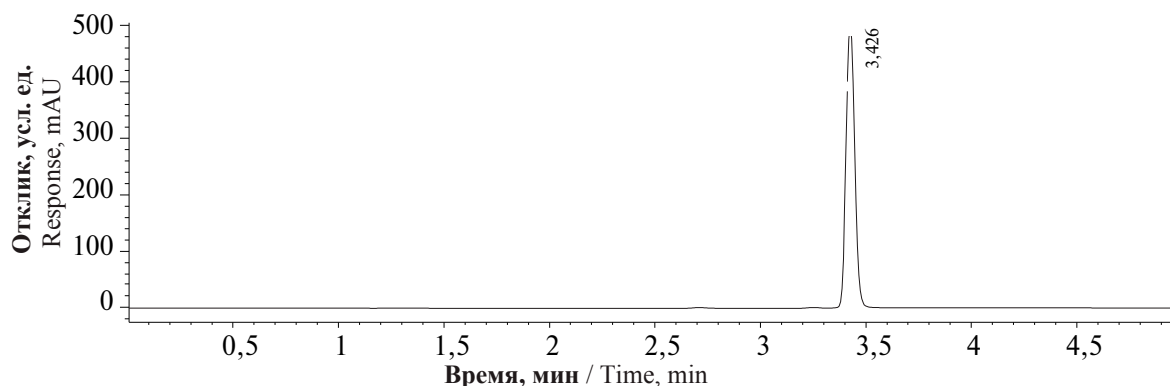


Рис. 2. Хроматограмма раствора стандартного образца фолиевой кислоты. Условия анализа: колонка 250×4,6 мм, силикагель октадецилсилильный (C18) деактивированный по отношению к основаниям, 5 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил — 0,05 М KH_2PO_4 (5:95); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 3,4 мин.

Fig. 2. Chromatogram of the folic acid reference standard. Column: 250×4.6 mm, silica gel for chromatography, octadecylsilyl (C18), base-deactivated, 5 μm . Mobile phase: acetonitrile–0.05 M KH_2PO_4 (5:95). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 3.4 min.

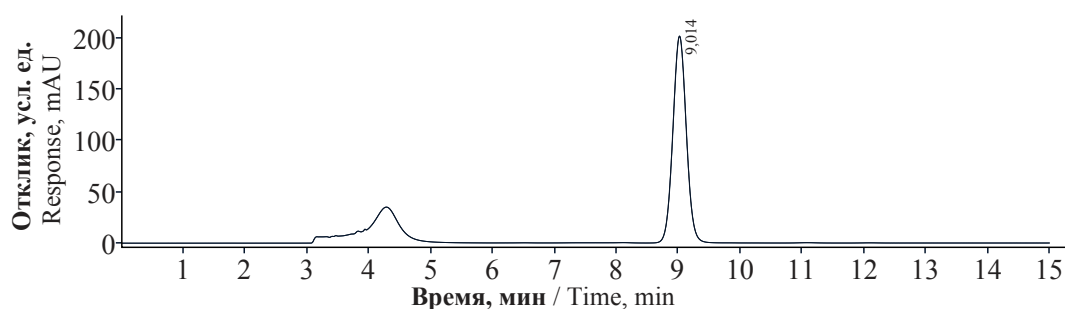


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси: «железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин». Условия анализа: колонка 250×4,0 мм силикагель октилсилильный (C8) эндкепированный, 5 мкм; подвижная фаза: метанол — 0,1 М KH_2PO_4 (12:88); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 9,0 мин.

Fig. 3. Chromatogram of the model mixture “Ferrous sulfate+Folic acid+Цианокобаламин”. Column: 250×4.0 mm, silica gel for chromatography, octylsilyl (C8), endcapped, 5 μm . Mobile phase: methanol–0.1 M KH_2PO_4 (12:88). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 9.0 min.

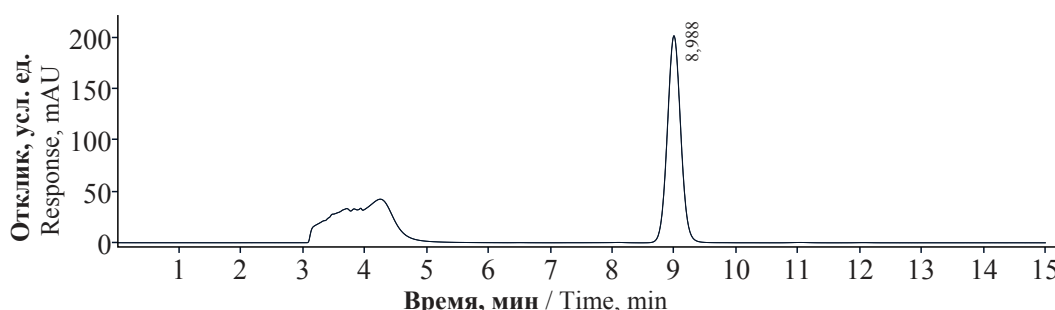


Рис. 4. Хроматограмма раствора стандартного образца фолиевой кислоты. Условия анализа: колонка 250×4,0 мм силикагель октилсилильный (C8) эндкепированный, 5 мкм; подвижная фаза: метанол — 0,1 М KH_2PO_4 (12:88); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 9,0 мин.

Fig. 4. Chromatogram of the folic acid reference standard. Column: 250×4.0 mm, silica gel for chromatography, octylsilyl (C8), endcapped, 5 μm . Mobile phase: methanol—0.1 M KH_2PO_4 (12:88). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 9.0 min.

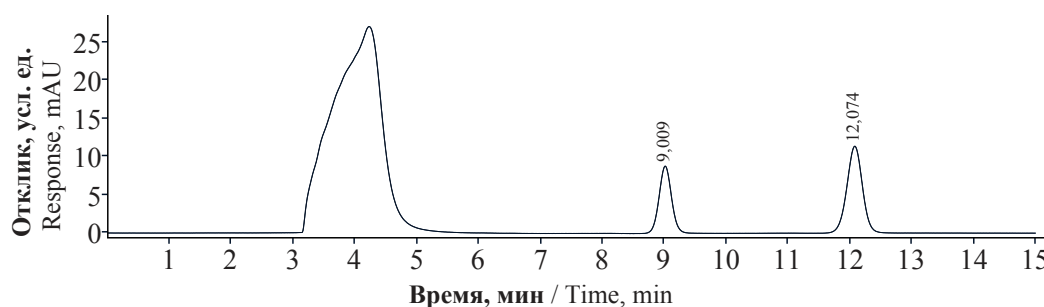


Рис. 5. Хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Условия анализа: колонка 250×4,0 мм силикагель октилсилильный (C8) эндкепированный, 5 мкм; подвижная фаза: метанол — 0,1 М KH_2PO_4 (12:88); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 9,0 мин, время удерживания птероевой кислоты — около 12,0 мин.

Fig. 5. Chromatogram of the system suitability solution. Column: 250×4.0 mm, silica gel for chromatography, octylsilyl (C8), endcapped, 5 μm . Mobile phase: methanol—0.1 M KH_2PO_4 (12:88). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 9.0 min, the retention time of pterioic acid—12.0 min.

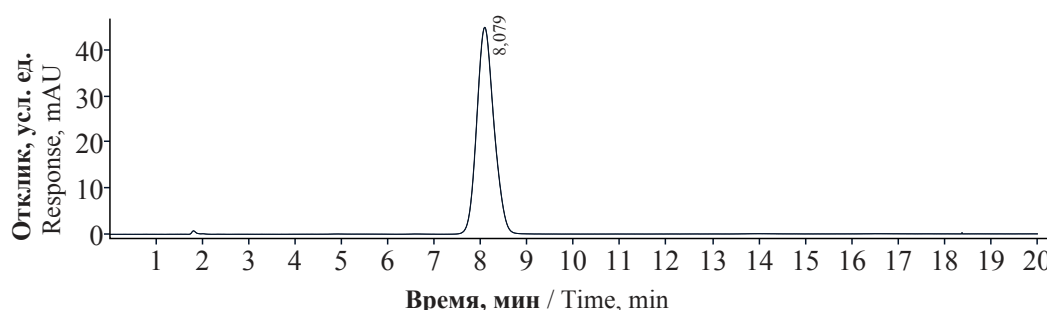


Рис. 6. Хроматограмма модельной смеси: «фолиевая кислота+цианокобаламин». Условия анализа: колонка 150×4,6 мм силикагель октадецилсилильный (C18) эндкепированный, 5 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил — 0,05 М KH_2PO_4 (5:95); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 8,1 мин.

Fig. 6. Chromatogram of the model mixture “Folic acid+Cyanocobalamin”. Column: 150×4.6 mm, silica gel for chromatography, octadecylsilyl (C18), endcapped, 5 μm . Mobile phase: acetonitrile—0.05 M KH_2PO_4 (5:95). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 8.1 min.

кислоты наблюдается в условиях, используемых для разделения смеси «железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин». В данных условиях возможно одновременное определение птероевой кислоты (родственной примеси D фармацевтической субстанции фолиевой кислоты), что не требует отдельных условий и колонки для контроля данной

примеси в препарате, а также значительно сокращает время и реактивы.

Еще одним преимуществом этой методики является состав растворителя для испытуемого образца (раствор, содержащий этилендиаминтетрауксусную кислоту с pH 9,5), использование которого позволяет избавиться от мешающих ионов железа,

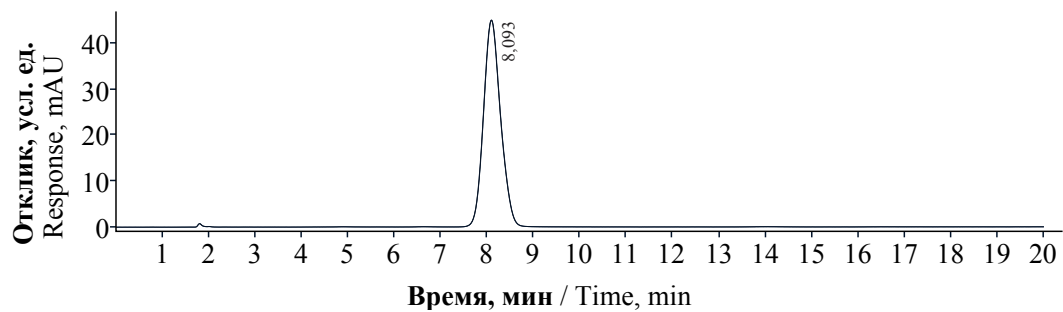


Рис. 7. Хроматограмма раствора стандартного образца фолиевой кислоты. Условия анализа: колонка 150×4,6 мм силикагель октадецилсилильный (C18) эндкепированный, 5 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил — 0,05 М KH_2PO_4 (5:95); детектирование 280 нм; время удерживания фолиевой кислоты — около 8,1 мин.

Fig. 7. Chromatogram of the folic acid reference standard. Column: 150×4.6 mm, silica gel for chromatography, octadecylsilyl (C18), endcapped, 5 μm . Mobile phase: acetonitrile—0.05 M KH_2PO_4 (5:95). Detection at 280 nm. The retention time of folic acid is about 8.1 min.

Таблица 2. Средние значения критериев пригодности хроматографической системы для стандартного образца фолиевой кислоты в рассмотренных условиях анализа ($n = 6$, $P = 95\%$)

Table 2. Mean values of the system suitability criteria for the folic acid reference standard under the given test conditions ($n = 6$, $P = 95\%$)

Наименование модельной смеси Model mixture	Относительное стандартное отклонение площади пика (RSD), % Relative standard deviation of the peak area	Фактор асимметрии пика (A) Asymmetry factor	Число теоретических тарелок (N) Plate number	Время удерживания фолиевой кислоты, мин Folic acid retention time
«Калия йодид+фолиевая кислота+цианокобаламин» Potassium iodide+folic acid+cyanocobalamin	0,72	1,08 ± 0,05	31410 ± 1302	3,42 ± 0,02
«Железа сульфат+фолиевая кислота+цианокобаламин» Ferrous sulfate+folic acid+cyanocobalamin	0,09	1,04 ± 0,01	8166 ± 16	9,00 ± 0,01
«Фолиевая кислота+цианокобаламин» Folic acid+cyanocobalamin	0,10	1,13 ± 0,01	2220 ± 50	8,07 ± 0,01

Примечание. n — количество хроматограмм; P — доверительная вероятность.
Note. n —number of chromatograms; P —confidence probability.

в той или иной форме присутствующих в качестве действующего вещества в некоторых поливитаминных препаратах в сочетании с фолиевой кислотой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение условий анализа фолиевой кислоты методом обращенно-фазовой ВЭЖХ показало, что все рассмотренные варианты позволяют определять фолиевую кислоту в изократическом режиме подачи подвижной фазы для представленных модельных смесей. Выявлено, что методика, предполагающая использование в качестве подвижной фазы смеси «метанол — фосфатный буферный раствор» рН 6,6 (12:88) при температуре 25 °С, колонки размером 250×4,0 мм с силикагелем октилсилильным (C8) эндкепированным (размер частиц 5 мкм) обладает рядом преимуществ: наименьшие значения относительного стандартного отклонения площади пика ($RSD = 0,09\%$) и фактора асимметрии пика ($A_s =$

1,04) фолиевой кислоты, возможность определения в этой же системе примеси D фармацевтической субстанции фолиевой кислоты, наличие этилендиамин-тетрауксусной кислоты в составе растворителя (рН 9,5). При выборе оптимальной унифицированной методики для анализа фолиевой кислоты в препаратах можно рекомендовать вышеуказанные условия.

Вклад авторов. *А. С. Алексеева* — подбор и анализ материалов, написание текста статьи; *М. В. Гаврилин* — анализ и систематизация полученных данных; *Т. Б. Шемерянкина* — редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; *М. С. Смирнова* — сбор данных литературы; *Е. П. Федорова* — редактирование текста публикации; *Т. М. Каргина* — редактирование текста публикации, *О. О. Новиков* — консультации, редактирование текста по экспериментальной части работы; *С. А. Ковалева* — выполнение экспериментальной части работы, редактирование текста; *Н. Н. Бойко* — выполнение экспериментальной части работы, редактирование текста.
Authors' contributions. *Anastasia S. Alekseeva*—search and analysis of materials, preparation of the draft of the paper; *Mikhail*

V. Gavrilin—analysis and systematisation of the obtained data; **Tatiana B. Shemeryankina**—editing of the text, approval of the final version of the paper for publication, **Maria S. Smirnova**—compilation of literature data; **Elena P. Fedorova**—editing of the text; **Tatiana M. Kargina**—editing of the text; **Oleg O. Novikov**—providing consultations, editing of the practical part of the paper; **Svetlana A. Kovaleva**—carrying out experimental part of the study, editing of the paper; **Nikolay N. Boyko**—carrying out experimental part of the study, editing of the paper.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных науч-

ных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Слепченко ГБ, Мартынюк ОА, Шелеметьева ОВ. Разработка методики определения в грудном молоке витаминов группы В. *Известия Томского политехнического университета*. 2008;312(3):58–61. [Slepchenko GB, Martynuk OA, Shelemetieva OV. Development of techniques for determining vitamins of group B in breast milk. *Izvestiya Tomskogo politekhnicheskogo universiteta = Bulletin of the Tomsk Polytechnic University*. 2008;312(3):58–61 (In Russ.)]
2. Capelli I, Cianciolo G, Gasperoni L, Zappulo F, Tondolo F, Capuccilli M, La Manna G. Folic acid and vitamin B12 administration in CKD, why not? *Nutrients*. 2019;11(2):383. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fnu11020383>
3. Gazzali AM, Lobry M, Colombeau L, Acherar S, Azais H, Mordon S, et al. Stability of folic acid under several parameters. *Eur J Pharm Sci*. 2016;93:419–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.045>
4. Jaszewski R, Misra S, Tobin M, Ullah N, Naumoff JA, Kucuk O, Levi E, Axelrod BN, Patel BB, Majumdar AP. Folic acid supplementation inhibits recurrence of colorectal adenomas: a randomized chemoprevention trial. *World J Gastroenterol*. 2008;14(28):4492–8. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.4492>
5. Qin T, Du M, Du H, Shu Y, Wang M, Zhu L. Folic acid supplements and colorectal cancer risk: meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep*. 2015;5:12044. <https://doi.org/10.1038/srep12044>
6. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *New Engl J Med*. 1999;341(20):1485–90. <https://doi.org/10.1056/NEJM19991113412001>
7. Ledermann JA, Canevari S, Thigpen T. Targeting the folate receptor: diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments. *Ann Oncol*. 2015;26(10):2034–43. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv250>
8. Narmani A, Rezvani M, Farhood B, Darkhor P, Mohammadnejad J, Amini B, et al. Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug Dev Res*. 2019;80(4):404–24. <https://doi.org/10.1002/ddr.21545>
9. Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis. *Trends Food Sci Technol*. 2005;16(6–7):253–66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.013>
10. Konings EJ. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. *J AOAC Int*. 1999;82(1):119–27. PMID: 10028680
11. Бендрисhev АА, Пашкова ЕБ, Пирогов АВ, Шпигун ОА. Определение водорастворимых витаминов в поливитаминных премиксах, биологически-активных добавках и фармацевтических препаратах методом высоко-эффективной жидкостной хроматографии с градиентным элюированием. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. 2010;51(4):315–24. [Bendryshev AA, Pashkova EB, Pirogov AV, Shpigun OA. Determination of water soluble vitamins in multivitamin premixes, biologically active dietary supplements and pharmaceutical preparation by HPLC with gradient elution. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya = Moscow University Bulletin. Series 2. Chemistry*. 2010;51(4):315–24 (In Russ.)]
12. Филимонов ВН, Сирицо СИ, Макрушин НА. Особенности хроматографического разделения водорастворимых витаминов в изократической ОФ ВЭЖХ. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2006;6(2):191–197 [Filimonov VN, Siritso SI, Makrushin NA. Features of chromatographic separation of water-soluble vitamins in isocratic RP HPLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy = Sorption and Chromatography Processes*. 2006;6(2):191–7 (In Russ.)]
13. Vahteristo L, Lehtikainen K, Ollilainen V, Varo P. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. *Food Chem*. 1997;59(4):589–97. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(96\)00318-4](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(96)00318-4)
14. Osseyi ES, Wehling RL, Albrecht JA. HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. *Cereal Chem*. 2001;78(4):375–8. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2001.78.4.375>
15. Шинева НВ, Гаврилин МВ, Старчак ЮА, Макаров СВ. Метрологические требования к измерительному оборудованию (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):173–81. [Shineva NV, Gavrilin MV, Starchak YuA, Makarov SV. Metrological requirements to measuring equipment. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration*. 2020;9(3):173–81 (In Russ.)] <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-173-181>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Алексеева Анастасия Сергеевна, канд. фарм. наук. Anastasia S. Alekseeva, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6094-8990>
Гаврилин Михаил Витальевич, д-р фарм. наук, профессор. Mikhail V. Gavrilin, Dr. Sci (Pharm.). Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2988-8627>

Шемерянкина Татьяна Борисовна, канд. фарм. наук. Tatiana B. Shemeryankina, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3720-9687>
Смирнова Мария Сергеевна. Maria S. Smirnova. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0305-5934>

Федорова Елена Павловна, канд. фарм. наук. Elena P. Fedorova, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4499-2190>

Каргина Татьяна Михайловна, канд. биол. наук Tatiana M. Kargina, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3788-6338>

Новиков Олег Олегович, д-р фарм. наук, профессор. Oleg O. Novikov, Dr. Sci (Pharm.). Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>

Ковалева Светлана Анатольевна, канд. хим. наук. Svetlana A. Kovaleva, Cand. Sci. (Chem.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3183-4388>

Бойко Николай Николаевич, канд. фарм. наук, доцент. Nikolay N. Boyko, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-9222-2935>

Статья поступила 05.04.2021

После доработки 07.06.2021

Принята к печати 20.09.2021

Article was received 5 April 2021

Revised 7 June 2021

Accepted for publication 20 September 2021