

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Методы количественного
определения витаминов

ОФС.1.2.3.0017.15
Взамен ст. ГФ XI, вып.2

В данной статье изложены общие принципы определения витаминов в субстанциях и лекарственных формах с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), спектрофотометрии и титриметрии.

Приведенные типовые методики позволяют количественно определять следующие соединения: витамин А (ретинол, ретинола ацетат и ретинола пальмитат), витамин D (холекальциферол и эргокальциферол), витамин Е (α -токоферол и α -токоферола ацетат), витамин К₁ (фитоменадион), β -каротин, витамины В₁ (тиамина хлорид, тиамина бромид и тиамина мононитрат), В₂ (рибофлавин, рибофлавинмононуклеотид), В₃ (кислоту никотиновую, никотинамид), В₅ (кислоту пантотеновую и ее соли, пантенол), В₆ (пиридоксина гидрохлорид), В_с (кислоту фолиевую), В₁₂ (цианокобаламин), витамин С (кислоту аскорбиновую или ее натриевую или кальциевую соли, аскорбилпальмитат), *d*-биотин, рутин.

Оборудование

В соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

Рекомендуемые условия. Колонка длиной 250 мм, диаметром 4,6 мм с октадецилсилилсиликагелем с размером частиц 5 мкм. Объем вводимой пробы 20 мкл. Скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин.

Допускается использование колонок других размеров с той же или большей эффективностью, а также других объемов введения и скоростей потока подвижной фазы при условии пригодности хроматографической системы.

Параметры пригодности хроматографической системы.

Разрешение между двумя соседними пиками должно быть не менее 1,5.

Факторы асимметрии пиков должны быть близки к единице, в предельном случае не менее 0,8 и не более 2.

Проведение расчетов. Содержание витамина в анализируемой субстанции в процентах (X_1) или в анализируемом препарате в миллиграммах (X_2) вычисляют по формулам:

$$X_1 = \frac{S \cdot a_0 \cdot N \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot N_0} ,$$

$$X_2 = \frac{S \cdot a_0 \cdot N \cdot G \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot N_0 \cdot 100} ,$$

где: S и S_0 – площади пиков определяемого витамина на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов соответственно;

a – навеска испытуемого препарата или субстанции, г;

a_0 – навеска стандартного образца, г;

N и N_0 – разведения при приготовлении испытуемого и стандартного растворов соответственно;

G – среднее значение массы единицы лекарственной формы, мг;

P – содержание основного вещества в стандартном образце, %.

Определение жирорастворимых витаминов

1. Определение витаминов А, D и Е в препаратах

Подвижная фаза: метанол – ацетонитрил (80:20).

Рекомендуемые концентрации витаминов в стандартном и испытуемом растворах:

Витамин А – от 0,5 до 3,5 мкг/мл;

Витамин D – от 2,0 до 10,0 мкг/мл;

Витамин Е – от 1,0 до 5,0 мг/мл.

Приготовление стандартных растворов. В зависимости от состава анализируемого препарата готовят стандартный раствор витаминов, содержащихся в этом препарате. Количества стандартных образцов ретинола ацетата, холекальциферола (или эргокальциферола) и α -токоферола ацетата (точные навески), примерно эквивалентные количеству этих витаминов, содержащихся в 1 таблетке (капсуле, дозе сиропа, геля или раствора), помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл. Туда же помещают кислоту аскорбиновую в количестве примерно 10:1 по отношению к навеске α -токоферола ацетата в качестве антиоксиданта. В колбу добавляют 15 мл воды и нагревают на водяной бане при 60 °С в течение 5 мин. Затем добавляют 25 мл спирта 96 % и 8 мл калия гидроксида раствора 50 % и нагревают на водяной бане с обратным холодильником при 60 °С в течение 30 мин. Полученную смесь охлаждают и экстрагируют гексаном (3 раза по 50 мл). Объединенные гексановые экстракты промывают водой до нейтральной реакции водного слоя по универсальной индикаторной бумаге и упаривают на роторном испарителе в колбе соответствующего объема при температуре не выше 60 °С. Остаток после упаривания растворяют в 25,0 мл подвижной фазы. При необходимости используют другое разведение для получения приемлемых для конкретных условий анализа концентраций витаминов.

При анализе субстанций готовят стандартные растворы с концентрацией определяемых витаминов в указанных выше пределах.

Приготовление испытуемого раствора. Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, примерно равную массе одной таблетки или содержимого одной капсулы. При анализе жидких или гелеобразных образцов берут точную навеску, примерно равную массе одной дозы препарата. Навеску порошка (жидкого или гелеобразного образца) помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл. Если в испытуемом образце содержится α -токоферола ацетат, но отсутствует

аскорбиновая кислота, туда же помещают аскорбиновую кислоту в количестве примерно 10:1 по отношению к навеске α -токоферола ацетата.

К навеске добавляют 15 мл воды и нагревают на водяной бане при 60 °С в течение 5 мин. Затем прибавляют 25 мл спирта 96 % и 8 мл калия гидроксида раствора 50 % и нагревают на водяной бане с обратным холодильником при температуре 60 °С в течение 30 мин. Полученную смесь охлаждают и экстрагируют гексаном (3 раза по 50 мл). Объединенные гексановые экстракты промывают водой до нейтральной реакции и упаривают на роторном испарителе в колбе соответствующего объема при температуре не выше 60 °С. Остаток после упаривания растворяют в 25,0 мл подвижной фазы. При необходимости используют другое разведение для получения приемлемых в конкретных условиях анализа концентраций витаминов.

При анализе субстанций готовят испытуемые растворы с концентрацией определяемых витаминов в указанных выше пределах.

При анализе масляных растворов приготовление испытуемого раствора проводят аналогичным образом с той только разницей, что воду (10 мл) добавляют через обратный холодильник не до, а после омыления, т. е. после нагревания смеси на водяной бане при температуре 60 °С.

Проведение анализа. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы. Операцию повторяют не менее двух раз.

Условия детектирования определяются составом анализируемого препарата и используемым оборудованием.

Определение каждого витамина можно проводить отдельно, детектируя витамин А при 326 нм, витамин Е при 292 нм и витамин D при 265 нм. Возможно также одновременно определять витамины А и Е, проводя детектирование при длине волны 300 нм.

Относительное время удерживания (по пику витамина Е): витамин А – около 0,35, витамин D – около 0,87.

2. Определение витаминов А и Е в масляных растворах, не содержащих витамин D

Количество препарата, соответствующее примерно 0,2 дозы (точная навеска), помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 1 мл метилхлорида, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. Полученный раствор анализируют, как указано в разделе «Определение жирорастворимых витаминов» (пункт 1, «Проведение анализа»).

3. Спектрофотометрическое определение ретинола ацетата и ретинола пальмитата в масляных растворах

Точную навеску препарата, указанную в фармакопейной статье (эквивалентную примерно 9 мг ретинола ацетата или 14 мг ретинола пальмитата), помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в изопропиловом спирте, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор разбавляют изопропиловым спиртом до получения раствора с концентрацией 3,0 – 3,5 мкг/мл для ретинола ацетата и 5,0 – 5,5 мкг/мл для ретинола пальмитата.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длинах волн 300, 326, 350 и 370 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют изопропиловый спирт.

Вычисляют отношения значений оптической плотности при 300, 350 и 370 нм к значению оптической плотности при 326 нм. Отношения не должны превышать 0,608 при 300 нм, 0,553 при 350 нм и 0,142 при 370 нм.

При выполнении этого условия содержание ретинола ацетата или пальмитата (X) в 1 мл препарата в граммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot \rho \cdot N}{100 \cdot A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 326 нм;

- N – разведение;
- ρ – плотность препарата, г/см³;
- a – навеска препарата, г;
- $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения при длине волны 326 нм (1530 для *транс*-ретинола ацетата или 975 для *транс*-ретинола пальмитата в спирте изопропиловом).

Если указанное условие не выполняется, количественное определение необходимо проводить методом ВЭЖХ (раздел «Определение жирорастворимых витаминов», п. 1).

Примечания.

1. 1,0 г *транс*-ретинола ацетата соответствует 2907000 МЕ витамина А. 1,0 г *транс*-ретинола пальмитата соответствует 1817000 МЕ витамина А.
2. Изопропиловый спирт (2-пропанол) при измерении относительно воды в кювете с толщиной слоя 10 мм должен иметь величину оптической плотности, не превышающую 0,01 в области от 320 до 350 нм и 0,05 в области от 280 до 300 нм.

4. Определение витамина K_1 (фитоменадиона)

Приготовление стандартного раствора. Около 0,06 г (точная навеска) стандартного образца фитоменадиона помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 10 мл метанола и после растворения доводят объем до метки тем же растворителем. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора. Навеску измельченного препарата (или аналогичное по содержанию определяемого витамина количество жидкого препарата), соответствующую примерно 60 мкг фитоменадиона, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 15 мл метанола, выдерживают в течение 5 мин при температуре 60 °С, быстро охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. При необходимости фильтруют через фильтр с размером пор 0,5 мкм.

При анализе субстанции витамина К₁ испытуемый раствор готовят так же, как стандартный раствор.

Проведение анализа. Подвижная фаза: метанол – метиленхлорид (92:8). Скорость элюирования 1 мл/мин. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы в тех же условиях, что и витамины А, D и E (см. п. 2.1). Детектирование при 248 нм.

5. Определение β-каротина

Содержание β-каротина в анализируемом препарате определяют спектрофотометрически после его экстракции.

Количество препарата, соответствующее примерно 300 мкг β-каротина (точная навеска), экстрагируют 10 мл диметилсульфоксида при встряхивании в течение 10 мин и выдерживают на водяной бане в течение 15 мин при температуре 55 °С. Быстро охлаждают до комнатной температуры, переносят в цилиндр с притертой пробкой, прибавляют 25 мл гексана, 3 мл воды и встряхивают в течение 2 – 3 мин. После разделения слоев 3,0 мл верхнего (гексанового) слоя переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученного раствора в максимуме поглощения при длине волны 450 нм относительно гексана.

Содержание β-каротина (X) в МЕ вычисляют по формуле:

$$X = \frac{1650000 \cdot A \cdot N \cdot G}{100 \cdot a \cdot A_{1\text{см}}^{1\%}} = \frac{16500 \cdot A \cdot N \cdot G}{2592 \cdot a},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

N – разведение испытуемого раствора;

G – средняя масса единицы лекарственной формы, г;

a – навеска испытуемого препарата, г;

1650000 – активность 1 г β-каротина, МЕ;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения β-каротина в гексане при длине волны 450 нм, равный 2592.

Анализ концентратов и субстанции β-каротина выполняют аналогичным образом.

Определение водорастворимых витаминов

Все водорастворимые витамины (за исключением витамина С в некоторых случаях) определяют методом ВЭЖХ (см. раздел «Определение жирорастворимых витаминов», пункт 1).

1. Определение витаминов В₁, В₂, В₃, В₆, В_С, С и рутина

Рекомендуемые концентрации витаминов в стандартном и испытуемом растворах:

Витамин В₁ – от 5 до 15 мкг/мл;

Витамин В₂ – от 3 до 8 мкг/мл;

Витамин В₃ (никотинамид и никотиновая кислота) – от 2 до 5 мкг/мл;

Витамин В_С (фолиевая кислота) – от 3 до 8 мкг/мл;

Витамин В₆ – от 5 до 10 мкг/мл;

Витамин С – от 150 до 300 мкг/мл;

Рутин – от 100 до 200 мкг/мл.

Приготовление подвижной фазы

Раствор А. Около 0,240 г (точная навеска) натрия пентансульфоната и 5 мл уксусной кислоты ледяной растворяют в смеси метанол – вода (25:75), переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор Б. Около 0,275 г (точная навеска) натрия гептансульфоната и 5 мл уксусной кислоты ледяной растворяют в смеси метанол – вода (25:75), переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Для получения подвижной фазы смешивают растворы А и Б в соотношении 5:3.

Приготовление стандартного раствора. В зависимости от состава анализируемого препарата готовят стандартный раствор витаминов рассматриваемой группы, содержащихся в этом препарате. Точные навески стандартных образцов витаминов В₁, В₂, В₆, никотинамида, В_с (фолиевой кислоты), С, рутина, примерно равные содержанию этих витаминов в 1 таблетке (капсуле, дозе) анализируемого препарата, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 20 мл подвижной фазы, нагревают в течение 20 мин на водяной бане при 60 °С, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора. Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, примерно равную массе одной таблетки или содержимого одной капсулы. При анализе жидких или гелеобразных образцов берут точную навеску, примерно равную массе одной дозы препарата. Навеску помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл. Далее поступают, как при приготовлении стандартного раствора, начиная со слов «добавляют 20 мл подвижной фазы». При необходимости используют другое разведение для получения приемлемых для конкретных условий анализа концентраций витаминов.

Проведение анализа. Последовательно хроматографируют предварительно отфильтрованные через фильтр с размером пор 0,5 мкм стандартный и испытуемый растворы, проводя детектирование при 280 нм. Операцию повторяют не менее двух раз.

1.1. Определение рутина отдельно от других водорастворимых витаминов

Для уменьшения времени удерживания рутина используют подвижную фазу состава метанол – вода (44,5:55,5) с рН 2,4 (рН устанавливают, добавляя по каплям фосфорную кислоту разведенную 10 %). Остальные операции проводят аналогично разделу «Определение водорастворимых витаминов» (пункт 1) с той разницей, что нагревание на водяной бане при 60 °С проводят

в течение 5 мин. Время удерживания рутина около 6 мин, детектирование при длине волны 360 нм.

2. Определение витамина В₅

Подвижная фаза: калия дигидрофосфата 0,05 М раствор (рН 2,8) – метанол (95:5).

Приготовление стандартного раствора. Готовят раствор стандартного образца витамина В₅ (пантотеновой кислоты, пантотената кальция или пантенола) в подвижной фазе с концентрацией около 200 мкг/мл в расчете на пантотеновую кислоту.

Приготовление испытуемого раствора. Точную навеску порошка растертых таблеток (содержимого капсул, жидкого или гелеобразного препарата), эквивалентную 10 мг витамина В₅, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 20 мл подвижной фазы, встряхивают 2 – 3 мин, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

Перед проведением анализа стандартный и испытуемый растворы фильтруют через фильтр с размером пор 0,5 мкм.

Проведение анализа. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы, проводя детектирование при 205 нм. Остальные условия указаны в пункте 1. Операцию повторяют не менее двух раз. Время удерживания витамина В₅ около 8,5 мин.

3. Определение витамина В₁₂

Методика 1

Подвижная фаза: метанол – вода (35:65).

Приготовление стандартного раствора. Готовят раствор стандартного образца цианокобаламина в воде, имеющий концентрацию около 0,5 мкг/мл.

Приготовление испытуемого раствора. Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, эквивалентную примерно 10 мкг цианокобаламина (при анализе жидких или

гелеобразных образцов отбирают точный объем или берут точную навеску, в которых содержание цианокобаламина примерно равно его содержанию в одной дозе препарата). Навеску помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, добавляют 20,0 мл воды и энергично встряхивают в течение 2 – 3 мин. Раствор фильтруют через фильтр с размером пор 0,5 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата (в случае жидких образцов раствор тщательно перемешивают).

Проведение анализа. Инжектируемый объем не менее 50 мкл. Остальные условия указаны в пункте 1. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы, проводя детектирование при 550 нм. Операцию повторяют не менее 2 раз. Время удерживания витамина В₁₂ около 5 мин.

Методика 2

Подвижная фаза: динатрия гидрофосфата безводного раствор 1 % (рН 3,5) – метанол (70:30).

Приготовление стандартного раствора. Готовят раствор стандартного образца цианокобаламина в воде с концентрацией около 0,5 мкг/мл.

Приготовление испытуемого раствора. Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, эквивалентную примерно 10 мкг цианокобаламина (при анализе жидких или гелеобразных образцов отбирают точный объем или берут точную навеску с содержанием цианокобаламина, примерно равным его содержанию в одной дозе препарата). Добавляют 20,0 мл подвижной фазы и встряхивают в течение 5 мин. Полученный раствор фильтруют через фильтр с размером пор 0,5 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата (в случае жидких образцов раствор тщательно перемешивают).

Проведение анализа. Инжектируемый объем не менее 50 мкл. Остальные условия указаны в пункте 1. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы, проводя детектирование при 361 нм. Операцию повторяют не менее двух раз. Время удерживания витамина В₁₂ около 5 мин.

Методика 3

Определение методом спектрофотометрии. Готовят раствор препарата в воде с концентрацией 20 – 25 мкг/мл. Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 361 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца цианокобаламина.

В качестве раствора сравнения используют воду.

При анализе инъекционных растворов содержание цианокобаламина (X) в 1 мл препарата в микрограммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot N \cdot 10^6}{A_0 \cdot V},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца цианокобаламина;

a_0 – навеска стандартного образца цианокобаламина (в пересчете на 100 % вещество), г;

N – разведение;

V – объем препарата, взятый для анализа, мл.

При анализе субстанций содержание цианокобаламина (X) в субстанции в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot C_0 \cdot N \cdot 100}{A_0 \cdot a},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца цианокобаламина;

C_0 – концентрация раствора стандартного образца цианокобаламина (в пересчете на 100 % вещество), г/мл;

a – навеска цианокобаламина (в пересчете на 100 % вещество), г;

N – разведение испытуемой субстанции.

Примечания.

1. Приготовление раствора стандартного образца цианокобаламина.

Около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл воды, взбалтывают 10 мин, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают

(раствор А). 2,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора А при хранении в защищенном от света месте 1 мес.

2. При отсутствии стандартного образца цианокобаламина можно использовать значение удельного показателя поглощения цианокобаламина при длине волны 361 нм, равное 207.

4. Определение *d*-биотина

Приготовление подвижной фазы. К 1,0 г натрия перхлората прибавляют 75 мл ацетонитрила и 1 мл фосфорной кислоты; после растворения добавляют воду до объема 1 л и доводят значение рН до 4,5 добавлением натрия гидроксида раствора 0,1 М.

Приготовление стандартного раствора. Готовят раствор стандартного образца *d*-биотина, имеющий концентрацию около 3 мкг/мл.

Приготовление испытуемого раствора. Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, примерно эквивалентную 75 мкг *d*-биотина. Аналогичную навеску берут при анализе жидких или гелеобразных образцов. Навеску помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 15 мл воды, нагревают на водяной бане при 60 °С в течение 5 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Перед проведением анализа стандартный и испытуемый растворы фильтруют через фильтр с размером пор 0,5 мкм.

При анализе субстанции биотина испытуемый раствор готовят так же, как стандартный раствор.

Проведение анализа. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы на колонке 250 × 4,6 мм, заполненной октилсилилсиликагелем с размером частиц 5 мкм, проводя детектирование при 200 нм. Остальные условия указаны в п. 1. Операцию повторяют не менее трех раз. Время удерживания *d*-биотина около 20 мин.

5. Титриметрическое определение витамина С

Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, примерно эквивалентную 0,1 г аскорбиновой кислоты. При анализе жидких или гелеобразных образцов берут аналогичную навеску. Навеску помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 10 мл воды очищенной и 10 мл хлористоводородной кислоты 2 %, встряхивая в течение 10 мин. Объем полученного раствора доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют; первые 10 мл фильтрата отбрасывают. 10,0 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты 2 %, 0,5 мл калия йодида раствора 1 %, 2 мл крахмала раствора 0,5 %, воду до общего объема 20 мл и титруют раствором калия йодата 0,00167 М до появления стойкого светло-синего окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл калия йодата раствора 0,00167 М соответствует 0,8824 мг $C_6H_8O_6$ (аскорбиновой кислоты).