

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Спектрофотометрическое
определение фосфора

ОФС.1.2.3.0020.15
Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод спектрофотометрического определения фосфора после окислительного разложения, в результате которого фосфор переводится в фосфат-ионы, образующие с молибденовой кислотой окрашенные соединения.

Выбор метода спектрофотометрического определения фосфора и способа минерализации связан с составом, свойствами лекарственного средства и количеством содержащегося в нем фосфора.

Минерализацию осуществляют методами:

- 1) сжигания в атмосфере кислорода;
- 2) сжигания с окислительными смесями концентрированных кислот;
- 3) сухой минерализацией – сплавлением с твердыми окислителями.

В ряде случаев (при определении фосфора фосфолипидов, нуклеиновых кислот и других соединений) до минерализации проводят выделение испытуемого вещества.

Определение фосфора нуклеиновых кислот по Спирину проводят спектрофотометрическим методом с определением оптической плотности при двух значениях длин волн 270 и 290 нм в ультрафиолетовой области спектра.

Способы минерализации

Метод 1. Сжигание в колбе с кислородом

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Метод сжигания в колбе с

кислородом».

Метод 2. Сжигание с окислительными смесями концентрированных кислот

Методика 1 (для препаратов из животного и растительного сырья). Точную навеску (или точный объем) препарата, указанную в фармакопейной статье, содержащую 0,2 – 0,3 мг фосфора, помещают в колбу Кьельдаля; прибавляют 3 мл серной кислоты концентрированной и 3 мл азотной кислоты концентрированной (или 3 мл хлорной кислоты), перемешивают. Колбу закрывают стеклянной воронкой и осторожно нагревают при 50 °С, постепенно усиливая нагрев до температуры 200 – 300 °С. Через 10 мин после начала нагревания прибавляют по каплям 1 мл азотной кислоты концентрированной; добавление кислоты по 1 мл повторяют каждые 5 мин до получения раствора слабо-желтого цвета. К охлажденному раствору осторожно небольшими порциями прибавляют 20 мл воды и кипятят еще 30 мин.

Одновременно в аналогичных условиях минерализуют контрольную пробу.

Методика 2 (преимущественно для витаминных препаратов с минералами). Точную навеску препарата, эквивалентную содержанию фосфора

100 мг или указанному в фармакопейной статье, помещают в колбу Кьельдаля или высокую термостойкую пробирку, прибавляют 25 мл азотной кислоты концентрированной, осторожно нагревают в течение 30 мин на газовой горелке, электрическом колбонагревателе или плитке, прибавляют 15 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и продолжают нагревание до исчезновения бурых паров.

Метод 3. Сухая минерализация

Методика 3 (для витаминных препаратов с минералами). Точную навеску предварительно подготовленного как описано в фармакопейной статье препарата помещают в платиновый или кварцевый тигель (при необходимости в препаратах с маслом тигель переносят в сушильный шкаф

при 110 °С на 10 мин или более для полной абсорбции масла магния оксидом), затем осторожно сжигают на открытом пламени газовой горелки или электроплитке в присутствии магния оксида (от 3,0 мг до 2,5 г; количество магния оксида должно быть указано в фармакопейной статье) до обугливания, затем продолжают сжигание в муфельной печи при температуре 800 – 1000 °С до тех пор, пока весь остаток не станет белого цвета (около 1 – 5 ч).

Спектрофотометрические методики определения фосфора

Образующиеся после минерализации фосфат-ионы взаимодействуют с молибденовой кислотой с образованием желтых гетерополикомплексов – фосфорномолибденовых кислот, переходящих под действием восстановителей (аскорбиновой кислоты, гидразина сульфата, эйконогена, метола или других) в фосфорномолибденовую синь, интенсивность окраски которой пропорциональна содержанию фосфора. Состав фосфорномолибденовой сини зависит от природы восстановителя, кислотности раствора, температуры и других условий. От природы восстановителя зависят скорость реакции, чувствительность метода, положение максимума поглощения.

Определяют положение максимума в спектре поглощения фосфорномолибденовой сини для испытуемого препарата. При необходимости перед проведением цветной реакции испытуемый раствор нейтрализуют натрия гидроксида раствором 5 М (или другой концентрации, указанной в фармакопейной статье) в присутствии 1 – 2 капель фенолфталеина раствора 1 %, избыток щелочи нейтрализуют серной кислоты раствором 0,05 М (или другой концентрации, указанной в фармакопейной статье).

Методика А (преимущественно для витаминных препаратов с минералами, с аскорбиновой кислотой). Метод минерализации и приготовление раствора должны быть указаны в фармакопейной статье. В три мерные колбы вместимостью 25 мл отдельно помещают 2,0 мл раствора,

приготовленного после минерализации, 2,0 мл стандартного раствора калия фосфата однозамещенного с концентрацией фосфора 20 мкг/мл (примечание 1) и 2,0 мл воды (контрольный раствор). В каждую из трех колб прибавляют по 10 мл ацетатного буферного раствора, рН 3,9 – 4,1 (примечание 14), 2,5 мл аммония молибдата раствора 1 % в растворе серной кислоты (примечание 15) и 2,5 мл свежеприготовленного аскорбиновой кислоты раствора 1 % (примечание 3), доводят объемы растворов ацетатным буферным раствором, рН 3,9 – 4,1, до метки и перемешивают. Точно через 10 мин после добавления аскорбиновой кислоты раствора 1 % измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов относительно контрольного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 740 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot C \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 10^6},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора;

C – концентрация фосфора в стандартном растворе калия фосфата однозамещенного, мкг/мл (20 мкг/мл);

a – навеска препарата, г;

V – объем воды, используемый для приготовления раствора после минерализации, мл.

Методика Б (преимущественно для препаратов из животного и растительного сырья). Проводят минерализацию, как указано в методике 1 метода 2. Содержимое колбы количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через сухой бумажный фильтр (обеззоленный «синяя лента»), отбрасывая первые 15 мл фильтрата. 15,0 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 35 мл воды, 5,0 мл восстанавливающего раствора (примечание 4), 10 мл раствора

аммония молибдата (примечание 6) и оставляют на 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Соотношение фильтрата и воды (общий объем 50 мл) может быть изменено в зависимости от содержания фосфора в фильтрате.

Параллельно в аналогичных условиях готовят стандартный и контрольный растворы, помещая в мерную колбу вместимостью 100 мл 20,0 мл стандартного раствора калия фосфата однозамещенного с содержанием фосфора 20 мкг/мл (примечание 1), 30 мл воды (стандартный раствор) или 50 мл воды (контрольный раствор) и те же количества реактивов, как для испытуемого раствора.

Точно через 10 мин в колбы с испытуемым, стандартным и контрольным растворами прибавляют по 20 мл насыщенного раствора натрия ацетата (см. примечание 5), доводят объем раствора в каждой колбе водой до метки (100 мл), тщательно перемешивают и через 20 – 25 мин измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 725 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольного раствора.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot C \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot V \cdot 10^6} = \frac{A \cdot C \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot V \cdot 10^6},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора;

C – концентрация фосфора в стандартном растворе калия фосфата однозамещенного, мкг/мл (20 мкг/мл);

a – навеска препарата, г;

V – объем фильтрата, взятый для реакции, мл;

20, 100, 100, 100 – объемы аликвотных частей растворов и вместимости мерных колб, мл.

Методика В (преимущественно для витаминных препаратов с минералами, с гидрохиноном). Способ минерализации, навеска препарата или содержание фосфора в пробе должны быть указаны в фармакопейной статье. Полученный остаток после минерализации с помощью воды количественно переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки. Отбирают 10,0 мл полученного раствора и переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Затем в три отдельные мерные колбы вместимостью 25 мл помещают по 5,0 мл испытуемого раствора, стандартного раствора калия фосфата однозамещенного с содержанием фосфора 20 мкг/мл (примечание 1) и воды (контрольный раствор), в каждую из трех колб прибавляют по 1 мл раствора аммония молибдата (примечание 9), 1 мл раствора гидрохинона (примечание 10) и 1 мл раствора натрия гидросульфита (примечание 11), перемешивают. Доводят объемы растворов в каждой колбе водой до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин, затем измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов относительно контрольного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 650 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot C \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 10 \cdot 10^6 \cdot 25} = \frac{A \cdot C \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 10 \cdot 10^6},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора;

C – концентрация фосфора в стандартном растворе калия фосфата однозамещенного, мкг/мл (20 мкг/мл);

a – навеска препарата, г;

5,10, 25, 100, 500 – объемы аликвотных частей растворов и мерных колб, мл.

Методика Г (для определения примесей или количественного определения фосфора, с эйконогеном). Полученный остаток после минерализации (методику выбирают в зависимости от природы вещества) растворяют в 10 мл воды и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, перемешивают, туда же прибавляют 0,75 мл раствора аммония молибдата (примечание 12), 1 мл раствора эйконогена (примечание 13), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Готовят стандартный раствор, помещая 1 – 3 мл стандартного раствора калия фосфата однозамещенного с содержанием фосфора 5 мкг/мл (примечание 1) в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляя те же реактивы, что и в испытуемый раствор.

Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов относительно контрольного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 620 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольного раствора.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot C \cdot 25 \cdot V_0 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 25 \cdot 10^6} = \frac{A \cdot C \cdot V_0 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 10^6},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора;

C – концентрация фосфора в стандартном растворе калия фосфата однозамещенного, мкг/мл (5 мкг/мл);

a – навеска препарата, г;

V_0 – объем стандартного раствора калия фосфата однозамещенного, мл;

25 – объем мерной колбы, мл.

Для нормирования предельного содержания примесей возможно сравнение оптических плотностей испытуемого и стандартного растворов. Оптическая плотность испытуемого раствора не должна превышать оптическую плотность стандартного раствора.

Методика Д (преимущественно для витаминных препаратов с минералами, с гидразина сульфатом). Остаток после минерализации (способ минерализации указывают в фармакопейной статье), содержащий от 0,25 до 1,50 мг фосфора, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл с помощью 40 – 50 мл воды, прибавляют 20 мл серной кислоты раствора 1 М и перемешивают. Если остаток не растворился, прибавляют еще небольшое количество серной кислоты раствора 1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл молибденового реагента (примечание 8), 50 мл воды и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученного раствора относительно контрольного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 830 нм в кювете с толщиной слоя 1 см и определяют концентрацию фосфора в испытуемом растворе по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. В мерные колбы вместимостью 100 мл помещают 2,0; 5,0; 7,5; 10,0 и 15,0 мл стандартного раствора калия фосфата однозамещенного с содержанием фосфора 10 мкг/мл (примечание 1), прибавляют по 20 мл молибденового реагента и далее поступают, как указано выше для испытуемого раствора.

Строят калибровочный график, откладывая по оси ординат оптическую плотность, а по оси абсцисс – концентрацию фосфора в мкг/мл.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 5 \cdot 10^6},$$

где C – концентрация фосфора, определенная по калибровочному графику, мкг/мл;

a – навеска препарата, г;

5, 100, 500 – объемы аликвотных частей растворов и мерных колб, мл.

Примечания.

Приготовление реактивов для спектрофотометрического определения фосфора. Вода и все используемые реактивы не должны содержать примесей фосфора, мешающих определению.

1. Приготовление стандартного раствора калия фосфата однозамещенного.

1.1. Основной стандартный раствор калия фосфата однозамещенного. 0,4395 г калия фосфата однозамещенного, высушенного до постоянной массы при температуре 105 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 700 – 800 мл воды, 20 мл 0,05 М раствора серной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор содержит 100 мкг/мл фосфора).

Срок годности полученного раствора 1 мес.

1.2. Из основного стандартного раствора готовят стандартные растворы калия фосфата однозамещенного для каждого метода в соответствии с приведенной ниже таблицей.

Методика	Содержание фосфора в стандартном растворе, мкг/мл	Количество основного стандартного раствора (с содержанием фосфора 100 мкг/мл), мл	Количество воды в мерной колбе, мл
А, Б, В	20	20,0	до 100
Г	5	5,0	до 100
Д	10	10,0	до 100

2. Приготовление 3 М раствора серной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл приливают 700 мл воды, осторожно по каплям при перемешивании и охлаждении (в сосуде с холодной водой) прибавляют 168 мл серной кислоты концентрированной; после охлаждения раствора до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки.

3. Приготовление аскорбиновой кислоты раствора 1 % (для методики А). Помещают 1,0 г аскорбиновой кислоты в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор используют в течение 1 дня.

4. Приготовление восстанавливающего раствора для методики Б. 4,0 г метола и 10,0 г натрия сульфита растворяют в 150 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл, прибавляют 196 г натрия метабисульфита, растворенного в 600 мл воды, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «Синяя лента».

Срок годности раствора 30 сут.

5. Приготовление насыщенного раствора натрия ацетата. 420 г натрия ацетата помещают в колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 500 мл воды,

перемешивают и оставляют на 1 сут. Раствор над осадком фильтруют через фильтр «Синяя лента».

Срок годности раствора 30 сут.

6. Приготовление раствора аммония молибдата для методики Б. 50,0 г аммония молибдата растворяют в 500 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора 3 М раствором серной кислоты до метки, перемешивают и фильтруют.

Срок годности раствора 30 сут.

7. Проба на содержание фосфора в реактивах 4, 5 и 6. При смешивании 5 мл восстанавливающего раствора, 10 мл раствора аммония молибдата и 20 мл насыщенного раствора натрия ацетата не должно появляться синего окрашивания.

8. Приготовление молибденового реагента для методики Д. Около 6,860 г (точная навеска) натрия молибдата растворяют в 200 мл воды (раствор А); 0,40 г гидразина сульфата растворяют в 100 мл воды (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 1000 мл с 500 мл воды осторожно прибавляют при охлаждении и перемешивании 100 мл серной кислоты концентрированной, туда же полностью переносят растворы А и Б, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Реагент используют свежеприготовленным.

9. Приготовление раствора аммония молибдата для методики В. 12,50 г аммония молибдата растворяют в 150 мл воды, прибавляют 100 мл раствора серной кислоты (37,5 мл серной кислоты концентрированной и 100 мл воды).

Срок годности раствора 14 сут.

10. Приготовление раствора гидрохинона. 0,50 г гидрохинона помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, прибавляют 1 каплю серной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

11. Приготовление раствора натрия гидросульфита. 20,0 г натрия гидросульфита помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности при хранении в темном месте 7 сут.

12. Приготовление раствора аммония молибдата для методики Г. 8,30 г аммония молибдата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 40 мл воды, прибавляют 33 мл серной кислоты разведенной (2 мл серной кислоты концентрированной в 7 мл воды), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 14 сут.

13. Приготовление раствора эйконогена. Готовят одним из двух способов.

А) 0,750 г натрия сульфита, 14,150 г натрия гидросульфита и 0,1050 г эйконогена помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор используют свежеприготовленным.

Б) Готовят сухую смесь из 5,0 г натрия сульфита, 94,3 г натрия гидросульфита и 0,70 г эйконогена при тщательном перемешивании. В день определения 1,5 г сухой смеси помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

14. Приготовление ацетатного буферного раствора рН 3,9 – 4,1. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 10 мл уксусной кислоты раствора 1 М, 25 мл натрия ацетата раствора 0,1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают; рН полученного раствора 3,9 – 4,1 (потенциометрически).

Срок годности полученного раствора 3 мес.

15. Приготовление аммония молибдата раствора 1 % в растворе серной кислоты для методики А. 1 г аммония молибдата растворяют в 50 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, прибавляют калиброванной пипеткой 0,11 мл серной кислоты разведенной (1 часть серной кислоты концентрированной и 5 частей воды) и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности полученного раствора 1 мес.

16. Приготовление 0,05 М раствора серной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 50 мл серной кислоты раствора 1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Определение фосфора нуклеиновых кислот по Спирину

Метод основан на измерении разности поглощений в ультрафиолетовой области при двух значениях длин волн после обработки испытуемого препарата раствором хлорной кислоты при нагревании. В фармакопейных статьях в зависимости от соотношения содержания нуклеиновых кислот (дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой, а также их фрагментов) допускаются модификации методик гидролиза.

Методика. К 1 мл раствора препарата, содержащего 15 – 35 мкг нуклеиновых кислот, помещенного в термостойкую центрифужную пробирку (или колбу), прибавляют 5 мл хлорной кислоты раствора 0,5 М (другие условия указывают в фармакопейной статье) и закрывают стеклянным колпачком или присоединяют воздушный холодильник. Смесь

нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения пробы при необходимости (при наличии осадка) центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин. Измеряют оптическую плотность гидролизованного прозрачного раствора или надосадочной жидкости при длинах волн 270 и 290 нм в кювете с толщиной слоя 1 см; при высоких значениях оптической плотности растворы разводят хлорной кислоты раствором 0,5 М (разведение должно быть указано в фармакопейной статье). В качестве контрольного раствора используют хлорной кислоты раствор 0,5 М.

Метод применим при выполнении условия: A_{270} и A_{290} не должны отличаться более чем на 15 %.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(A_{270} - A_{290}) \cdot N \cdot 100}{\Delta A_{1\text{см}} \cdot b \cdot a \cdot 10^6},$$

где A_{270} – оптическая плотность испытуемого раствора при 270 нм;

A_{290} – оптическая плотность испытуемого раствора при 290 нм;

N – разведение препарата (в данном описании равно 6);

$\Delta A_{1\text{см}} = 0,19$ – разность удельных показателей поглощения нуклеиновых кислот при длинах волн 270 и 290 нм при содержании фосфора 1 мкг/мл;

b – толщина поглощающего слоя, см;

a – навеска препарата, г.