

ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МУЛЬТИВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСАХ COMPARATIVE METHODS OF THE ANALYSIS OF ASCORBIC ACID IN MULTIVITAMIN-MINERAL COMPLEXES

Хюинь Тхи Хонг Гам
Huynh Thi Hong Gam

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва
I.M. Sechenov First Moscow Medical State University, Moscow, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метод анализа, аскорбиновая кислота, мультивитаминно-минеральные комплексы

KEY WORDS: method of analysis, ascorbic acid, multivitamin-mineral complexes

РЕЗЮМЕ: Представлен обзор данных литературы по применению различных методов количественных определений аскорбиновой кислоты в мультивитаминно-минеральных препаратах.

ABSTRACT: There presented a review of literature data on application of different methods to quantitative determination of ascorbic acid in multivitamin-mineral preparations.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших задач химико-фармацевтической промышленности является повышение качества лекарственных средств. Эта задача может быть успешно решена только при условии разработки эффективных методов исследования и оценки качества лекарственных средств, что составляет одно из главных направлений фармацевтической науки на современном этапе.

Среди лекарственных средств, применяемых в настоящее время в медицине в лечебных и профилактических целях, значительное место продолжают занимать витаминные препараты. Широкое использование поливитаминно-минеральных комплексов в медицинской практике, увеличение их производства ставит определенные задачи перед фармацевтической наукой, в частности, разработку методов анализа витаминов, входящих в состав поливитаминных препаратов. Определенные трудности в разработке методов анализа мультивитаминно-минеральных препаратов вызваны тем, что состав этих комплексов сложен, они содержат много компонентов, которые являются соединениями различной химической структуры.

Несмотря на то что в современной литературе имеется обширная информация о возможностях использования инструментальных методов в контроле качества многокомпонентных препаратов, они еще недостаточно используются в фармацевтическом анализе. Причиной тому, по-видимому, является отсутствие сравнительной характеристики результатов, достигнутых в этой области по отдельным группам лекарственных средств.

В настоящей статье приводится краткий обзор работ, посвященных применению физико-химических методов в анализе мультивитаминно-минеральных препаратов, содержащих аскорбиновую кислоту.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МУЛЬТИВИТАМИННО- МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСАХ

Для разделения и количественного определения водорастворимых витаминов можно применять химические методы анализа, оптические, а также различные хроматографические методики, поскольку молекулы этих соединений содержат ионогенные группы.

Титриметрические методы являются традиционными в определении разнообразных витаминов. Выраженные восстановительные свойства кислоты аскорбиновой лежат в основе нескольких методик количественного определения данного лекарственного вещества: йодатометрия, йодометрия, йодхлорметрия (Фармацевтическая химия, 2004). В литературе (The Japanese Pharmacopoeia, 2007;

United States Pharmacopoeia, 2007) описано титрование 2,6-дихлорфенолиндофенолом в некоторых поливитаминных препаратах. Но титриметрические методики применяются главным образом в анализе субстанций, монокомпонентных лекарственных средств и малопригодны при анализе многокомпонентных лекарственных форм, содержащих наряду с определенным веществом и другие аналогичные по свойствам соединения.

Метод спектрофотометрии позволяет определить, как правило, только один витамин в препарате, следовательно, неудобен для анализа поливитаминных препаратов.

Метод флуориметрии используется в автоматизированном определении аскорбиновой кислоты в поливитаминных препаратах (United States Pharmacopoeia, 2007).

С использованием метода хроматоденситометрии проводят количественное определение витамина С в поливитаминных препаратах (Postaire et al., 1991).

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в настоящее время является основным методом качественного и количественного определения водорастворимых витаминов. Газовая хроматография не составляет конкуренции жидкостной ввиду термической лабильности этой группы лекарственных веществ.

В связи с сильными восстановительными свойствами кислоты аскорбиновой, ее анализ методом ВЭЖХ требует тщательного подбора и соблюдения условий подготовки пробы и хроматографирования. Следует по возможности ограничить контакт пробы с металлом, а при наличии в препарате солей металлов (Cu^{2+} , Fe^{2+}), катализирующих окисление витамина С, связать ионы при подготовке пробы, добавляя к экстрагенту 0,1 М соляную кислоту (Крученков, Нечаева, 1998).

Определение аскорбиновой кислоты осложняется присутствием в изучаемой пробе таких соединений, как, например, дегидроаскорбиновая кислота. Поэтому необходимо позаботиться, чтобы на стадии предварительной обработки аскорбиновая кислота не окислялась до дегидроаскорбиновой, не поглощающей в УФ-области спектра.

Возможности применения хроматографического анализа для определения витамина С в фармацевтических препаратах были изучены рядом исследователей (Количественный анализ..., 1990).

Особый интерес представляют методики, позволяющие определять несколько водорастворимых витаминов (в том числе витамин С) одновременно. Именно в таких методиках наиболее полно раскрываются все преимущества метода ВЭЖХ (Тее, Кхор, 1996).

Предложен метод определения витаминов в поливитаминных препаратах (Amin, Reusch, 1990): жидкостной хроматограф со спектрофотометрическим детектором; стальная колонка Vertex LiChrosorb RP 250 x 4 мм; подвижная фаза для хро-

матографирования метанол — вода — 85% фосфорная кислота (55 : 45 : 1); длина волны 254 нм; скорость потока подвижной фазы 1,5 мл/мин. В указанных условиях время удерживания витамина С — 1,1 мин, витамина B_{12} — 1,4 мин, витамина B_2 — 1,8 мин, никотинамида — 2,1 мин, фолиевой кислоты — 2,4 мин, витамина B_6 — 2,7 мин, витамина B_1 — 3,2 мин. Чувствительность метода составляет 5–10 нг витаминов.

Методика определения водорастворимых витаминов в поливитаминных препаратах «Центрум» и «Юникап» разработана сотрудниками Института клинической фармакологии НЦ ЭГКЛС (Демидова, 2002). Определение витаминов B_1 , B_2 , B_6 , С и РР проводится на обращенно-фазовом сорбенте в изократических условиях со спектрофотометрическим детектором. Разделение проводится на колонке Диасорб 130-С16Т, 250 x 4 мм, 7 мкм. Подвижная фаза — ацетонитрил : фосфатный буфер (20 : 80) с введением ион-парного реагента С7/8 (1,2 мг/л). Условия проведения анализа: длина волны 254 нм, скорость потока подвижной фазы 0,8 мл/мин. В этих условиях время удерживания витамина РР составляет 1,2 мин, витамина С — 2,5 мин, витамина B_6 — 4,9 мин, витамина B_2 — 7 мин, витамина B_1 — 12 мин. Диапазон измеряемых величин витаминов составляет 0,2–50 мкг. С.В. Ульяновой и соавт. (Ульянова и др., 1993) предложена методика анализа витамина С в драже «Гексавит» на колонке Silasorb C_{18} размером 250 x 4,6 и 120 x 2 мм. Предварительно было изучено хроматографическое поведение витаминов B_1 , B_2 , B_6 , С и никотинамида в зависимости от соотношения компонентов подвижной фазы и режима элюирования. Для оптимизации разделения анализируемых витаминов применяли различные системы растворителей: водно-метанольные смеси с добавками ион-парных реагентов (натриевых солей алкилсульфокислот). В результате исследования в качестве элюента выбрана смесь водных растворов гексил- и гептилсульфонатов натрия и метанола в соотношении 75 : 25. Оптимальное значение величины рН устанавливали с помощью ледяной уксусной кислоты. Исследование эффективности экстракции водорастворимых витаминов из драже «Гексавит» показало, что используемый элюент является оптимальным экстрагентом. При скорости подвижной фазы 1 мл/мин время удерживания витамина С — 4 мин.

Староверов и соавт. (2004) определяли витамин С в сиропе «Олиговит» методом ВЭЖХ. Работа выполнялась на хроматографе Gilson с УФ-детектором с варьируемой длиной волны с использованием колонки 4 x 250 мм Диасфер 110—С18, 6 мкм. Анализируемые образцы «Олиговит» перед хроматографированием разбавляли в 150 раз элюентом и фильтровали через фильтр 0,45 мкм. Скорость подвижной фазы — 1 мл/мин. Для детектирования использовали: $\lambda = 210$ нм. Подвижная фаза: $1,50 \cdot 10^{-3}$ М раствор тетрабутиламмония дигидроор-

тофосфата в 0,01 М растворе натрия дигидроортофосфата в смеси воды с 8 об.% ацетонитрила. В работе Ivanovic et al. (1999) также описано определение V_1 , V_2 , V_3 , V_6 и С в препарате «Олиговит». В качестве подвижной фазы используется гексасульфат натрия и триэтаноламин (рН 3,5).

Компоненты, содержащиеся в поливитаминных препаратах, разделяли на колонке C_{18} в потоке подвижной фазы, содержащей октиламин (Perez-Ruiz et al., 1997) или на колонке μ -Bondapak C_{18} с использованием смеси вода — метанол (70 : 30) с добавкой реагента для ион-парной хроматографии.

Была разделена смесь рибофлавина, пиридоксина, аскорбиновой кислоты и тиамин (элюент — смесь ацетонитрила и 0,01 М Na_2HPO_4 в соотношении 80 : 20, рН 3). На колонке с фазой C_2 были разделены ниацин, пиридоксин, тиамин, рибофлавин, аскорбиновая кислота (указаны в порядке элюирования) при градиентном элюировании от 5 до 60% метанола в 0,5% водном растворе гексадецилтриметиламмоний бромида (3,8%/мин) (Amin et al., 1990).

Интересный подход описан в литературе (United States Pharmacopoeia, 2007), авторы которой заменили органические ион-парные соединения неорганическими ионами в высокой концентрации. Разделение проводилось на колонке, заполненной силикагелем с привитыми октадецильными группами.

Аскорбиновую и никотиновую кислоты, тиамин, пиридоксин разделяли на колонке с привитыми метокси-(3-морфоаминопропил)-силилендиоксигруппами, элюируя 0,1 М натрия октансульфонатом (рН 4 или 6) (Yama et al., 1990).

А.И. Лутцева и соавт. (1998) отмечают целесообразность использования метода ВЭЖХ, который позволяет устранить недостатки действующих нормативных документов и проводить качественное и количественное определение не только действующих веществ в поливитаминных препаратах без их предварительного аналитического разделения, но и примесей, образующихся в процессе производства или хранения препаратов, а также вспомогательных веществ.

Одновременное определение С и V_{12} в фармацевтических препаратах, после твердофазной экстракции, на колонке Lichrosorb RP-18 в потоке смеси CH_3OH — 0,05 М $COONH_4$ в градиентном режиме со скоростью 1 мл/мин и детектированием при 270 и 290 нм (Fotsing et al., 1997) или на колонке μ Bondapak C_{18} с размером 300 x 3,9 мм в потоке смеси: метанол — KH_2PO_4 — вода при обнаружении детектором с диодной матрицей описано в работе (Zaporozhets, Krushinskaya, 2002). В другой работе (Тее, Khor, 1996) описано одновременно определение V_1 , V_2 , V_6 , V_{12} , С, ниацина, ниацинамида и фолиевой кислоты в потоке метанола с добавлением ион-парных реагентов: триэтиламина и аммиака. В работе Booth et al. (1998) использовали ВЭЖХ после твердофазной экстракции для

определения С и V_{12} в мультивитаминных комплексах.

HPLC/ESI-MS применяется для одновременного определения таурина и 10 водорастворимых витаминов (в том числе и С) в поливитаминных таблетках (Chen et al., 2006). В данной работе определяли витамины на колонке Johnson Spherigel C_{18} размером 250 x 4,6 мм в градиентном режиме.

Методом МЭКХ (мицеллярная электрокинетическая хроматография) определяли V_1 , V_6 , никотинамид, РР, С, V_{12} и V_2 с УФ-детекцией при 254 нм (Nishi, 1997). Метод обладает достаточно высокой разрешающей способностью и точностью для использования в фармацевтическом анализе, однако пока редко применяется в анализе лекарственных препаратов.

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) — сравнительно новый метод анализа витаминов. Приборы для КЭ немного дороже оборудования для ВЭЖХ, но метод быстро окупается ввиду малых затрат на реактивы. Этот метод применяется для количественного определения витаминов V_1 , V_2 , V_3 , V_6 , V_{12} , С, никотинамида и пантотеновой кислоты в фармацевтических препаратах (Colnaghi et al., 2006). Применяется метод зонного капиллярного электрофореза для определения витамина С в поливитаминных препаратах в среде фосфатного буфера (рН 8,5) с помощью ультрафиолетового детектора (Fotsing et al., 1997). В перечисленных выше работах отмечается высокая точность метода, эффективность разделения и быстрота выполнения анализа. Метод МЭКХ и КЭ являются перспективными альтернативами методу ВЭЖХ.

Авторы работы (Barthus et al., 2005) использовали метод вольтамперометрии для одновременного определения витаминов С, V_6 , РР в фармацевтических препаратах на стеклоуглеродном электроде. Применяется вольтамперометрия в определении аскорбиновой кислоты в поливитаминно-минеральных препаратах (Ijeri et al., 2001).

Электрохимические методы в настоящее время практически не включаются в НД, по-видимому, по причине сложности и недостаточной распространенности оборудования, а также токсичности используемой в полярографах ртути.

Таким образом, рассмотрение вопросов качественного и количественного анализа витаминных препаратов в сравнительном аспекте с одновременной характеристикой возможностей каждого из рассматриваемых методов и областей их наиболее возможного применения в фармацевтическом анализе позволяет сделать вывод, что для анализа витаминов в многокомпонентных препаратах наиболее целесообразно использовать селективный и универсальный метод ВЭЖХ, а в перспективе — и электрокинетические методы. В отдельных случаях возможно применение методов ТСХ (уступающих перечисленным выше методам в отношении точности), производной спектрофотометрии и флуориметрии.

ЛИТЕРАТУРА

Демидова О.А. Оценка содержания водорастворимых витаминов в лекарственных препаратах и биологических жидкостях методом ВЭЖХ // Автореф. дис. канд. фарм. наук. М., 2002. 26 с.

Количественный анализ хроматографическими методами / Под ред. Э. Кэц. М.: Мир, 1990. 320 с.

Крученков А.А., Нечаева Е.Б. Стабилизация процесса окисления аскорбиновой кислоты на стадии экстракции вещества из минералосодержащих поливитаминных препаратов. Тез. V конгр. «Человек и лекарство». М., 1998. С. 655.

Лутцева А.И., Евтушенко Н.С., Маслов Л.Г. Основные направления повышения уровня стандартизации и контроля качества витаминных препаратов. Тез. V конгр. «Человек и лекарство». М., 1998. С. 658.

Староверов В.М., Дейнека В.И., Григорьев А.М. ВЭЖХ-анализ водорастворимых витаминов в составе поливитаминного сиропа «Олиговит» // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. № 3. С. 54—56.

Ульянова С.В., Щавлинский А.Н., Морев С.Н. и др. Использование физико-химических методов в анализе поливитаминных препаратов, содержащих водорастворимые витамины В₁, В₂, В₆, С и никотинамид // Фармация. 1993. № 3. С. 50—51.

Фармацевтическая химия / Под. ред. А.П. Арзамасцева. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 640 с.

Якушина Л.М., Бекетова Н.А., Бендер Е.Д., Харитончик Л.А. Использование методов ВЭЖХ для определения витаминов в биологических жидкостях и пищевых продуктах // Вопросы питания. 1993. № 1. С. 43—47.

Amin M., Reusch J. Simultaneous Determination of vitamin B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, nicotinamide and folic acid in capsule preparations by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography // Analyst. 1990, 112(7):989—991.

Barthus R.C., Mazo L.H., Poppi R.J. Simultaneous determination of vitamins C, B₆ and PP in pharmaceuticals using differential pulse voltammetry with a glassy carbon electrode and multivariate calibration tools // J Pharm Biomed Anal. 2005, 38:94—99.

Booth C.K., Clark T., Fenn A. Folic acid, riboflavin, thiamine and vitamin B₆ status of a group of first-time blood donors // Am J Clin Nutr. 1998, 68(5):1075—1080.

Chen Z., Chen B., Yao S. High performance chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets // Anal Chem Acta. 2006, 569:169—175.

Fotsing L., Fillet M., Bechet I. Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis // J Pharm Biomed Anal. 1997, 15(8):1113—1123.

Ijeri V.S., Jaiswal P.V., Srivastava. A.K. Chemically modified electrodes based on macrocyclic compounds for determination of Vitamin C by electrocatalytic oxidation // Analytica Chimica Acta. 2001, 439(2):291—297.

Ivanovic D., Popovic A., Radulovic D., Medenica M. Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals // J Pharm Biomed Anal. 1999, 18(6):999—1004.

Nishi H. Pharmaceutical applications of micelles in chromatography and electrophoresis // J Chromatogr A. 1997, 780(1—2):243—264.

Papadoyannis I.N., Tsioni G.K., Samanidou V.F. Simultaneous determination of nine water and fat soluble vitamins after SPE separation and RP-HPLC analysis in pharmaceutical preparations and biological fluids // J Liq Chromatogr Relat Technol. 1997, 20(19):3203—3231.

Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Tomas V., Sidrach C. Flow injection fluorimetric determination of ascorbic acid based on its photooxidation by thionine blue // Analyst. 1997, 122:115—118.

Postaire E., Cisse M., Hoang M.D.Le, Pradeau D. Simultaneous determination of water-soluble vitamins by over-pressure layer chromatography and photodensitometric detection // J Pharm Sci. 1991, 80(4):368—370.

Simionato A.V.C., Lancas F.M., Ruggiero M.A. Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography in pharmaceutical samples // J Liq Chromatogr Relat Technol. 2006, 29(3):349—363.

Tee E.-S., Khor S.-C. Development of a HPLC method for the simultaneous determination of several B-vitamins and ascorbic acid HPLC // Mal J Nutr. 1996a, 2:49—65.

Tee E.-S., Khor S.-C. Simultaneous determination of B-vitamins and ascorbic acid in multi-vitamin preparations by reversed-phase HPLC // Mal J Nutr. 1996b, 2:176—194.

The Japanese pharmacopoeia. 15th ed. Tokyo: The Ministry of Health, Labour and Welfare, 2006. 1788 p.

The United States pharmacopoeia. 30th rev. Rockville, MD: U.S. Pharmacopoeial Convention. 2007.

Yama S., Nakashima K., Shirakawa N., Yamada K. New column packing materials for separation of water-soluble vitamins by high-performance liquid chromatography // Bull Chem Soc Jpn. 1990, 63(10):2809—3813.

Zaporozhets O.A., Krushinskaya E.A. Determination of ascorbic acid by molecular spectroscopic techniques // Journal of Analytical Chemistry. 2002, 57(4):286—297.