

© Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2011
УДК 543.544: 543.867: 615.454.1

Визначення вмісту жиророзчинних вітамінів у вітамінному пероральному гелі для дітей «Живіталь»

С.М.Запорожська, І.І.Баранова, Д.С.Пуляєв, Т.О.Ткач, А.Шейхалі

Національний фармацевтичний університет
Харків, Україна

Розроблено методики кількісного визначення активних компонентів гелю (вітамінів) методом високоефективної рідинної хроматографії з попередньою пробопідготовкою, що дозволяє контролювати їх якість у розробленій м'якій лікарській формі і використовувати для лікування і профілактики гіповітамінозів.

Ключові слова: пероральний гель, кількісне визначення, жиророзчинні вітаміни.

ВСТУП

На сьогоднішній момент у педіатричній практиці актуальною проблемою є лікування і профілактика гіповітамінозів у дітей різної етіології, оскільки вітаміни майже не виробляються в організмі, а їх надходження в організм дитини необхідне для здійснення нормального обміну речовин у період росту і розумового розвитку [3]. Нами було розроблено препарат спрямованої дії для корекції вмісту в організмі дитини життєво важливих вітамінів, необхідних для щоденного вживання [6, 8].

З цією метою в лікарську форму було введено наступні вітаміни: А, Е, Д.

Метою дослідження було розробити методику кількісного визначення вітамінів — активних компонентів гелевої форми для її стандартизації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Визначення проводили методом високо ефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) [1,

2, 7] за методиками ДФУ (2.2.29) [4]. Запропонована нами методика заснована на відділенні активних речовин від гелю, зокрема пектину, який при подальшому центрифугуванні залишався в осаді. Визначення проб вітамінів (надосадова рідина) проводили на рідинному хроматографі з УФ-детектором у різних умовах. Для визначення вітамінів А, Е, Д використовували колонку Microsorb 100 C₈ розміром 250*4,6 мм з розміром часток 5 мкм.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Кількісне визначення вмісту ретинолу ацетату (вітаміну А) [4, 5].

Близько 1 г (точна наважка) препарату поміщали в конічну колбу ємністю 100 мл із пришліфованою пробкою, додавали 5 мл води Р, 15 мл розчинника А та 3 мл розчину калію гідроксиду, поміщали на водяну баню при температурі 55-65°С на 15 хв. при постійному перемішуванні [4]. Після охолодження додавали 7 мл води Р та 25,0 мл розчинника Б. Закривали пробкою та інтенсивно струшували протягом 1 хв. Ополіскували стінки колби 60 мл води Р і давали розшаруватися. Фільтрували необхідну кількість верхнього шару крізь мембранний фільтр 0,45 мкм. Паралельно готували зразок розчину РСЗ ретинолу ацетату поміщали в конічну колбу ємністю 50 мл із пришліфованою пробкою, додавали 5 мл води Р, 5 мл розчинника А та 3 мл розчину калію гідроксиду, поміщали на водяну баню і далі діяли таким же чином, як і при приготуванні зразка випробуваного розчину.

По 100 мкл зразків випробуваного розчину препарату і розчину РСЗ ретинолу ацетату навперемінно хроматографували на рідинному хроматографі з УФ-спектрофотометричним детектором у наступних умовах:

ТАБЛИЦЯ 1
Кількісний вміст ретинолу ацетату в ЛП
«Живіталь»

Взято на аналіз		Знайдена кількість, мг
Маса наважки гелю, г	Кількість ретинолу ацетату, мг/г	
1,099	0,10	0,10
1,009	0,12	0,11
1,010	0,09	0,09
1,006	0,10	0,10
1,002	0,10	0,10

Примітки: (P=95%; t=2,1318; X; n=5)

- колонка Microsorb 100 NH2 розміром 250×4,6 мм з розміром часток 5 мкм або аналогічна, для якої виконувалися вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;

- дегазована рухома фаза;
- швидкість рухомої фази — 3 мл/хв.;
- детектування при довжині хвилі 335 нм;
- температура колонки — 40,0°C.

Вміст ретинолу ацетату в ретиноловому еквіваленті (X) в міліграмах на 1 г препарату обчислювали за формулою (1):

$$X = \frac{S \times m_0 \times 5 \times 0,871 \times P \times 10 \times 1000}{S_0 \times 50 \times 50 \times 100 \times m} = \frac{S \times m_0 \times P \times 0,174}{S_0 \times m}, \quad (1)$$

де: S — середнє значення суми площ піків 13-цис- та транс-ретинолів, розраховане з хроматограм випробуваного розчину;

m_0 — маса наважки РСЗ ретинолу ацетату, г;
P — вміст ретинолу ацетату в РСЗ ретинолу ацетату, %;

0,174 — коефіцієнт перерахунку ретинолу ацетату на ретиноловий еквівалент;

S_0 — середнє значення площі піку ретинолу, розраховане з хроматограм розчину РСЗ ретинолу ацетату;

m — маса наважки препарату, г [4].

1 мкг ретинолу ацетату = 0,001 мг ретинолу ацетату відповідають 3,33 МО активності вітаміну А в ретиноловому еквіваленті (ЕР).

Вміст ретинолу ацетату в ретиноловому еквіваленті в 1 г препарату повинен становити від 0,09 мг до 0,11 мг.

Результати кількісного визначення ретинолу ацетату в ЛП «Живіталь» наведені в табл. 1.

2. Кількісне визначення вмісту холекальциферолу (вітаміну D₃) [4, 5].

Близько 30 г (точна наважка) препарату поміщали в конічну колбу ємністю 250 мл, додавали 10 мл води Р, 20 мл спирту Р та інтенсивно струшували до розчинення чи утворення гомогенної емульсії.

Додавали 150 мл гексану Р. Переносили в ділильну лійку ємністю 500 мл, давали розчину розшаруватися, зливали нижній шар (емульсію) назад у колбу, а верхній прозорий шар фільтрували крізь шар натрію сульфату безводного Р у грушоподібну колбу ємністю 250 мл. Відганяли розчинник з грушоподібної колби на ротаційному випарнику під вакуумом при температурі не вище 30°C. Повторювали процедуру екстракції ще два рази з новими порціями гексану Р по 150 мл, кожного разу фільтруючи гексановий шар через той самий шар натрію сульфату безводного в ту саму грушоподібну колбу і відганяючи гексан під вакуумом. Промивали шар сульфату натрію безводного 20 мл гексану Р у ту ж грушоподібну колбу. Відганяли розчинник на ротаційному випарнику під вакуумом до сухого залишку. Залишок розчиняли і переносили кількісно трьома порціями по 3 мл триметилпентану Р у мірну колбу ємністю 10 мл, доводили об'єм у колбі триметилпентаном Р до мітки та перемішували. Фільтрували крізь мембранний фільтр 0,45 мкм.

По 100 мкл випробуваного розчину препарату і розчину РСЗ холекальциферолу поперемінно хроматографували на рідинному хроматографі з УФ-спектрофотометричним детектором у наступних умовах:

- колонка Microsorb 100 NH2 розміром 250×4,6 мм з розміром часток 5 мкм або аналогічна, для якої виконувалися вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;

- дегазована рухома фаза;
- швидкість рухомої фази — 1 мл/хв.;
- детектування при довжині хвилі 265 нм;
- температура колонки — 30,0°C.

Вміст холекальциферолу (X) у МО на 1 г препарату обчислювали за формулою (2):

$$X = \frac{S \times m_0 \times 1 \times 5 \times P \times 10}{S_0 \times 50 \times 100 \times 50 \times m} = \frac{S \times m_0 \times P}{S_0 \times m}, \quad (2)$$

де: S — середнє значення площі піку холекальциферолу, розраховане з хроматограм випробуваного розчину;

m_0 — маса наважки РСЗ холекальциферолу, г;
P — вміст холекальциферолу в РСЗ холекальциферолу, МО;

S_0 — середнє значення площі піку холекальциферолу, розраховане з хроматограм розчину РСЗ холекальциферолу;

m — маса наважки препарату, г.

Результати кількісного визначення холекальциферолу в ЛП «Живіталь» наведені в табл. 2. Вміст холекальциферолу в 1 г препарату повинен становити від 0,125 мкг до 0,126 мкг.

ТАБЛИЦЯ 2
Кількісний вміст холекальциферолу в ЛПІ
«Живіталь»

Взято на аналіз		Знайдена кількість, мкг/г
Маса наважки, г	Кількість холекальциферолу, мг/г	
30,099	0,125	0,124
29,998	0,124	0,124
30,039	0,126	0,125
30,019	0,127	0,125
29,920	0,128	0,126

Примітки: $P=95\%$; $t=2,1318$; X ; $n = 5$

1 МО холекальциферолу складає 0,000025 мг (0,025 мкг) хімічно чистого вітаміну D, 1 мкг=40 МО.

3. Кількісне визначення вмісту α -токоферолу (вітаміну E) [4, 5].

Близько 4 г (точна наважка) препарату поміщали в конічну колбу ємністю 100 мл із пришліфованою пробкою, додавали 20 мл води Р, 30 мл спирту Р та 3,5 г калію гідроксиду Р, поміщали на водяну баню при температурі 55°C і витримували протягом 1 год. при постійному переміщенні.

Після охолодження переносили в ділильну лійку. Ополіскували колбу 50 мл гексану Р і переносили в ту саму ділильну лійку. Інтенсивно струшували протягом 1 хв., давали розшаруватися та зливали нижній шар в іншу ділильну лійку.

Додавали 50 мл гексану Р, інтенсивно струшували протягом 1 хв., давали розшаруватися та зливали нижній шар. Верхній (гексановий) шар зливали в першу ділильну лійку. Додавали 25 мл води Р, інтенсивно струшували протягом 1 хв., давали розшаруватися та зливали нижній шар. Додавали до гексанового шару 3 краплі оцтової кислоти Р та повторювали промивання ще двома порціями по 25 мл води Р. Фільтрували гексановий шар крізь шар натрію сульфату безводного Р, змочений кількома мілілітрами гексану Р, у грушовидну колбу ємністю 250 мл. Промивали ділильну лійку і шар сульфату натрію двома порціями по 20 мл гексану в ту ж саму колбу. Відганяли гексан на ротаційному випарнику під вакуумом при температурі 50°C до сухого залишку. Одразу ж після того додавали піпеткою 5,00 мл розчинника А і після розчинення сухого залишку фільтрували крізь мембранний фільтр 0,45 мкм. По 100 мкл випробуваного розчину препарату і розчину

ТАБЛИЦЯ 3
Кількісне визначення α -токоферолу ацетату в ЛПІ «Живіталь»

Взято на аналіз		Знайдена кількість, мг/г
Маса наважки, г	Кількість α -токоферолу, мг/г	
4,01	0,72	0,71
4,00	0,75	0,74
3,98	0,75	0,75
3,96	0,78	0,76
3,99	0,7	0,68

Примітки: $P=95\%$; $t=2,1318$; $-X$; $n = 5$.

РСЗ dl- α -токоферолу ацетату навперемінно хроматографували на рідинному хроматографі з УФ-спектрофотометричним детектором у наступних умовах:

- колонка Microsorb 100 C18 розміром 250*4,6 мм з розміром часток 5 мкм або аналогічна, для якої виконувалися вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;

- дегазована рухома фаза;
- швидкість рухомої фази — 3 мл/хв.;
- детектування при довжині хвилі 291 нм;
- температура колонки — 40,0°C.

Вміст dl- α -токоферолу ацетату в перерахунку на d- α -токоферол (X) в міліграмах на 1 г препарату обчислюють за формулою (3):

$$X = \frac{S \times m_0 \times 5 \times 0,67 \times P \times 5 \times 1000}{S_0 \times 50 \times 50 \times 100 \times m} = \frac{S \times m_0 \times P \times 0,335}{S_0 \times m}, \quad (3)$$

де: S — середнє значення площі піку α -токоферолу, розраховане з хроматограм випробуваного розчину;

m_0 — маса наважки РСЗ dl- α -токоферолу ацетату, г;

P — вміст dl- α -токоферолу ацетату в РСЗ dl- α -токоферолу ацетату, %;

0,67 — коефіцієнт перерахунку на d- α -токоферол;

S_0 — середнє значення площі піку α -токоферолу, розраховане з хроматограм розчину РСЗ dl- α -токоферолу ацетату;

m — маса наважки препарату, г.

Вміст dl- α -токоферолу ацетату в перерахунку на d- α -токоферолу ацетату в 1 г препарату повинен становити від 0,7 мг до 0,8 мг. 1 МО складає 1 мг α -токоферолу ацетату.

Результати кількісного визначення α -токоферолу ацетату в ЛПІ «Живіталь» наведені в табл. 3.

ВИСНОВОК

На підставі проведених досліджень була визначена кількість жиророзчинних вітамінів у розробленому гелі та складено проект АНД, що регламентує якість гелю «Живіталь» за вказаним кількісним вмістом діючих речовин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Запорожская С.Н. Количественное определение кислоты аскорбиновой в витаминном препарате для детей / С.Н.Запорожская, И.И.Баранова // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: зб. наук. ст. — Запоріжжя, 2006. — Т.1, Вип. XV. — С. 229-230.
2. Запорожська С.М. Використання методу рідинної хроматографії для визначення вмісту вітамінів у пероральному гелі для дітей / С.М.Запорожська, С.М.Губар, І.М.Грубник // Фармац. журн. — 2009. — №3 — С. 74-77.
3. Лапшин В.Ф. Современные принципы витаминпрофилактики и витаминотерапии в детском возрасте / В.Ф.Лапшин // Современная педиатрия. — 2007.— №1. — С. 100-104.
4. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — С. 49.
5. Стандартизація хроматографічного аналізу лікарських засобів. Сообщ. 1. Метрологические аспекты применения высокоэффективной жидкостной хроматографии / А.И.Гризодуб, М.Г.Левин, Д.А.Леонтьев [и др.] // Фармаком. — 1995. — №7. — С. 8-19.
6. Дранік Л.І. М'які лікарські форми та допоміжні речовини для їхнього виробництва / Л.І.Дранік // Фармац. журн. — 1990. — №3. — С. 45-47.
7. Daas A.G.J. Relationship Between Content Limits, System Suitability for Precision and Acceptance. Rejection Criteria for Assays Using Chromatographic Methods / A.G.J.Daas, J.H.McB.Miller // Pharmeuropa. — 1999. — Vol. 1, №4. — P. 571-577.
8. Walter R.H. The Chemistry and Technology of Pectin / R.H.Walter. — New York: Academic Press Inc., 1991. — P. 20.

С.Н.Запорожская, И.И.Баранова, Д.С.Пуляев, Т.А.Ткач, А.Шейхали. Определение содержания жирорастворимых витаминов в витаминном пероральном геле для детей. Харьков, Украина.

Ключевые слова: пероральный гель, количественное определение, жирорастворимые витамины.

Разработаны методики количественного определения активных компонентов геля (витаминов) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с предварительной пробоподготовкой, что позволяет контролировать их качество в разработанной мягкой лекарственной форме и использовать для лечения и профилактики гиповитаминозов.

S.N.Zaporozhskaya, I.I.Baranova, D.S.Pulyaev, T.A.Tkach, A. Sheyhali. Determination of concentration of oil soluble vitamins in oral gel for children. Kharkiv, Ukraine.

Key words: oral gel, quantification, fat-soluble vitamins.

The methods of quantitative determination of active components of gel (vitamins) are developed by the method of high of liquid chromatography with preliminary sample preparation that allows controlling their quality in the developed soft medicinal form and using for treatment and prophylaxis of hypovitaminosis.

Надійшла до редакції 19.09.2011 р.