



О.Л. Левашова, С.Н. Коваленко

Особенности определения аскорбиновой кислоты в витаминно-минеральном комплексе *Gesticare*

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Ключові слова: вітамін С, аскорбінова кислота, методи аналізу, вітамінно-мінеральний комплекс.

Ключевые слова: витамин С, аскорбиновая кислота, методы анализа, витаминно-минеральный комплекс.

Key words: vitamin C, ascorbic acid, methods of analysis, vitamin-mineral complex.

Стаття присвячена специфіці методу визначення аскорбінової кислоти у вітамінно-мінеральному комплексі *Gesticare*, заснованому на окислювально-відновній реакції з 2,6-дихлорфенол-індофенолятом натрію (реактивом Тільманса).

Статья посвящена специфике метода определения аскорбиновой кислоты в витаминно-минеральном комплексе *Gesticare*, основанном на окислительно-восстановительной реакции с 2,6-дихлорфенол-индофенолятом натрия (реактивом Тильманса).

The article is devoted the specific of method of determination of ascorbic acid in a vitamin-mineral complex *Gesticare*, based on a redox reaction with a 2,6-dichlorophenol-indophenol sodium (reagent Til'mansa).

Каждый человек остро нуждается в витаминах, и потребность в них чрезвычайно важна в нашей повседневной жизни. Недостаток витаминов в организме человека вызывает в начале заболевания средней интенсивности (гиповитаминозы), а при длительном недостатке тяжелые заболевания (авитаминозы). В зависимости от того, какого именно витамина не хватало в пище, возникают различные заболевания. Каждый человек нуждается в ежедневном поступлении 16 различных витаминов, 2 из них могут заменяться провитаминами, такими как каротин (провитамин А) и провитамин D (бета-ситостерин), которые в организме могут переходить в соответствующие витамины. Необходим и ряд витаминоподобных веществ в виде биофлавоноидов, холина, инозина, липоевой, оротовой, пангамовой, п-аминобензойной кислот и других [1–3].

Потребность женщины в витаминах во время беременности повышается в 1,5–2 раза. Недостаточная обеспеченность витаминами женщины в период зачатия ребенка и беременности может быть причиной врожденных аномалий развития, гипотрофии, недоношенности, нарушений физического и умственного развития детей. Будущие матери испытывают повышенную потребность, прежде всего, в витаминах А, С, В₁, В₆, фолиевой кислоте. Как показали исследования Института питания [4], половине всех беременных женщин не хватает аскорбиновой кислоты. Поэтому современные специализированные витаминно-минеральные комплексы являются важнейшим элементом питания беременных женщин и кормящих матерей [5–8].

Витаминно-минеральный комплекс *Gesticare* предназначен для улучшения питательного статуса женщин в течение беременности и послеродовой период для всех кормящих и не кормящих матерей как дополнительный источник витаминов и минеральных веществ. *Gesticare* улучшает самочувствие беременной: уменьшает проявления токсикоза и защищает от стрессов, способствует снижению риска преждевременных родов, врожденных уродств и коронарной болезни сердца [9].

Цель работы

Оценка метода анализа аскорбиновой кислоты в витаминно-минеральном комплексе *Gesticare* (Жестикер), рекомендован для беременных женщин, содержит холин, комплекс витаминов группы В (В₁, В₂, В₃, В₆, В₉, В₁₂), витамины С, Д₃, Е и микроэлементы: Fe (железа фумарат), Са (карбонат кальция), J (калия йодид), Zn (цинк оксид). Витамины и микроэлементы *Gesticare* активизируют обмен веществ и оказывают многоплановое комплексное действие по укреплению иммунной системы беременных женщин и кормящих матерей [9].

Материалы и методы исследования

L-аскорбиновая кислота (АК, витамин С) (C₆H₈O₆) (γ-лактон 2,3-дегидро-гулоновой кислоты, формула I) – Мм -176, t_{пл} 192°C, [α] +23° (вода), растворима в воде (22,4% при 20°C), спирте (4,6%), не растворима в органических растворителях, λ_{макс} 245 нм (в кислой среде), 265 нм (в нейтральной среде). Дегидро-L-аскорбиновая кислота (ДАК) (C₆H₆O₆) (γ-лактон 2,3-декето-гулоновой кислоты, формула II) – Мм -174, t_{пл} 237–240°C (с разл.), [α] +55° (рис. 1) [10–12].



Рис. 1. Структура аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот.

Методы определения аскорбиновой кислоты

Существует множество различных химических методов определения содержания аскорбиновой кислоты: титриметрические и колориметрические методы анализа, спектрофотометрический анализ, фотоколориметрический и хроматографические [10].

Для количественного определения аскорбиновой кислоты в витаминно-минеральном комплексе Gesticare применяли метод визуального титрования, используя окислительно-восстановительную реакцию с 2,6-дихлорофенол-индофенолятом натрия, известным также как реактив Тильманса.

На основании этой реакции разработана методика количественного определения аскорбиновой кислоты, которая состоит из следующих разделов:

1. Цель
2. Ответственность
3. Определение
4. Материалы и оборудование
5. Частота
6. Особенности
7. Процедура
- приготовление раствора метафосфорной кислоты уксусной кислоты;
- приготовление стандартного раствора дихлорофенол-индофенола;
- стандартизация полученного раствора.
- приготовление раствора образца и его титрование.
8. Расчеты
9. Приложения

Цель – количественное определение аскорбиновой кислоты в витаминно-минеральном комплексе Gesticare.

Для работы использовали реактивы, которые отвечают требованиям USP.

Сырье: 2,6-дихлорофенол-индофенолят натрия (Fisher, сертифицирован ACS (American Chemical Society), USA), метафосфорная кислота (Fisher, сертифицирована ACS, USA), аскорбиновая кислота (стандарт 99,9% USP QIG135), карбонат натрия (Fisher, Canada), дистиллированная вода.

Лабораторная посуда – мерная посуда класса А, Fisher (USA).

Особенности методики

Стандартный раствор дихлорофенол-индофенолята натрия (ДИФ) необходимо использовать в течение 3 дней и стандартизировать непосредственно перед использованием.

Титрование проводят до появления слабозеленой окраски, устойчивой в течение нескольких секунд.

Концентрацию аскорбиновой кислоты определяют по количеству реактива Тильманса, пошедшего на титрование.

Процедура

Приготовление раствора метафосфорной кислоты уксусной кислоты.

15 г метафосфорной кислоты растворить в 40 мл ледяной уксусной кислоты и достаточном количестве воды до 500 мл.

Приготовление стандартного раствора дихлорофенол-индофенолята

К 50 мг 2,6-дихлорофенол-индофенолята натрия доба-

вить 50 мл воды, содержащей 42 мг бикарбоната натрия, перемешать и, когда краситель растворится, добавить воды до 200 мл. Отфильтровать в светозащищенную емкость с притертым горлом.

Стандартизация полученного раствора

Точно взвесить 50 мг аскорбиновой кислоты, перенести в 50 мл мерную колбу с помощью метафосфорной кислоты долить до объема. Немедленно перенести 2 мл раствора аскорбиновой кислоты в 50 мл коническую колбу, содержащую 5 мл раствора метафосфорной уксусной кислоты, титровать раствором ДИФ до четкого розового цвета, который не исчезает в течение 5 секунд.

Для контрольного определения используют 7 мл метафосфорной уксусной кислоты плюс объем воды, равный объему ДИФ, использованного при титровании раствора аскорбиновой кислоты.

Приготовление раствора образца и его титрование

Взвесить и измельчить не менее 20 таблеток. Перенести и точно взвесить эквивалент около 100 мг аскорбиновой кислоты в 200 мл мерную колбу, добавить 75 мл метафосфорной уксусной кислоты. Закрыть колбу и перемешивать (механически) в течение 30 минут. Долить при помощи воды до объема и снова перемешать. Перенести часть раствора в тубу для центрифугирования, центрифугировать до образования прозрачного раствора.

Примечание: раствор образца должен быть оттитрован в течение 24 часов после приготовления.

Отмерить пипеткой 4,0 мл в 50 мл конусную колбу, добавить 5 мл метафосфорной уксусной кислоты, титровать раствором ДИФ до розового цвета, который не исчезает в течение 5 секунд. Откорректировать объем ДИФ по контрольному измерению: 5,5 мл метафосфорной уксусной кислоты и 15 мл воды. Содержание аскорбиновой кислоты в каждой таблетке рассчитывается по эквиваленту стандарта ДИФ по отношению к АК.

Расчеты. Титр стандартного раствора дихлорофенол-индофенолята рассчитывают по формуле:

$$[W_{std} \times P \times 2 \text{ мл} / 50 \text{ мл}] \times 1 / (V_{std} - V_{blk}) = T_{std}, \text{ мг/мл}$$

где W_{std} – масса стандарта аскорбиновой кислоты, мг;

P – концентрация стандарта в %;

V_{std} – объем использованный для титрования стандарта, мл;

V_{blk} – объем использованный для контрольного титрования, мл.

Расчет образца

$$(V_{std} - V_{blk}) \times T_{std} \times (1/4,0 \text{ мл}) \times (200 \text{ мл} / W_{spl}) \times Wave = \text{Результат, мг/таб}$$

где td – объем использованный для титрования образца, мл;

V_{blk} – объем использованный для контрольного титрования, мл;

T_{std} – титр стандарта дихлорофенол-индофенола, мг/мл;

W_{spl} – масса образца, мг;

$Wave$ – средняя масса образца, мг/таб.

Результаты и их обсуждение

Содержание аскорбиновой кислоты в таблетке витаминно-минерального комплекса Gesticare должен быть в пределах 108–144 мг/таб. Метод основан на редуцирующих свойствах аскорбиновой кислоты. Наиболее характерным свойством аскорбиновой кислоты является

ее способность давать химически и термодинамически обратимую окислительно-восстановительную (ОВ) систему. Окисление может быть вызвано действием различных веществ, в частности, кислорода воздуха, метиленового синего, перекиси водорода и других. Этот процесс, как правило, не сопровождается снижением витаминной активности. При окислении образуется дегидроаскорбиновая кислота, что обуславливается наличием в молекуле редко встречающейся в природе эндиольной группировки. Последняя способна легко окисляться в дикетогруппировку, обуславливая тем самым восстановительную способность аскорбиновой кислоты. Дегидроаскорбиновая кислота, однако, является менее стойким соединением и в слабощелочной и даже нейтральной среде подвергается превращению в дикетогулоновую кислоту, лишенную биологической активности (рис. 2) [10].

Принцип метода

2,6-дихлорфенол-индофенолят натрия образует 2 реакции.

Одна реакция обуславливается изменением pH среды, как у обычных ацидометрических индикаторов. Переход окраски происходит между pH 4 и 5, в этом интервале индикатор имеет фиолетовый цвет. Вторая реакция – окислительно-восстановительная. В ее результате ДИФ (который в щелочной среде имеет интенсивно-синюю окраску, а в кислой – светло-розовую) восстанавливается до бесцветного соединения, окисляя аскорбиновую кис-

лоту до дегидроаскорбиновой (рис. 3). Эту последнюю реакцию и используют для определения аскорбиновой кислоты.

Кислотные растворы исследуемого вещества титруют раствором индикатора (известного титра) до приобретения розового окрашивания, обуславливаемого избытком индикатора в кислой среде. Точность метода во многом зависит от применяемой техники анализа. Так как аскорбиновая кислота является весьма лабильным веществом, то в растертом анализируемом объекте она быстро окисляется, превращаясь в дегидроаскорбиновую кислоту. Поэтому все операции, связанные со взятием средней пробы материала для анализа, измельчением и растиранием навески и т. п., должны быть выполнены возможно быстрее.

Титриметрия в фармакопейном анализе – это основной прямой метод количественного определения субстанций и готовых лекарственных средств. Допуски содержания составляют при этом обычно 95–105% от номинального содержания.

В ЕФ, USP, ГФУ введены методические рекомендации по проведению валидации аналитических методик контроля качества лекарственных средств [13–15]. Однако применение их к титриметрическому методу анализа наталкивается на определенные трудности, связанные с большим разнообразием факторов, влияющих на точность титриметрических методик. Так, при вычислении результатов титриметрических определений наименее точная цифра – количество миллилитров титранта, из-

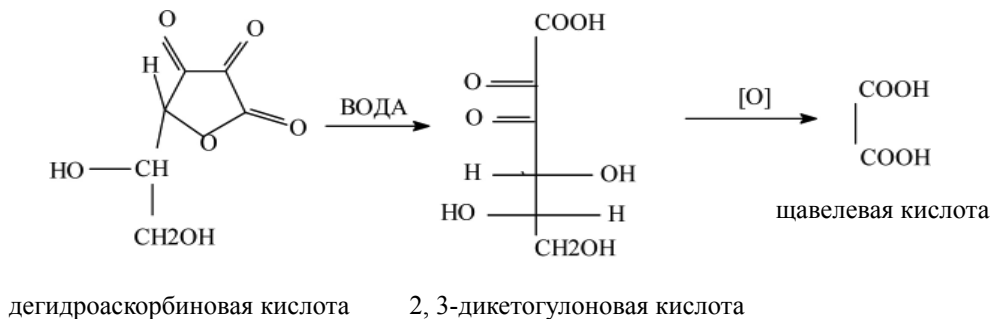


Рис. 2. Реакция окисления дегидроаскорбиновой кислоты.

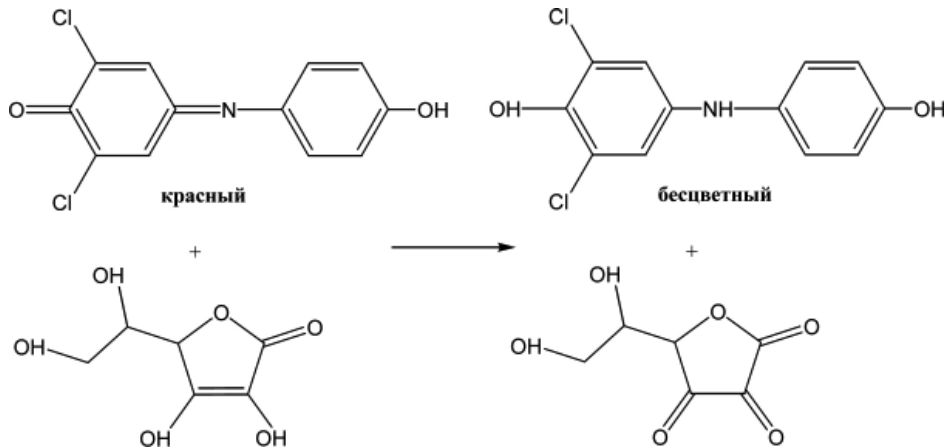


Рис. 3. Реакция с реактивом Тильманса.

расходованного на титрование. В современных бюретках, в зависимости от класса их точности, максимальная ошибка отмеривания составляет около $\pm 0,02$ мл. Ошибка от натекания тоже равна $\pm 0,02$ мл. Если при указанной общей ошибке отмеривания и натекания $\pm 0,04$ мл на титрование расходуется 20 мл титранта, то относительная ошибка составит 0,2%. При уменьшении навески и количества миллилитров титранта точность соответственно уменьшается. Таким образом, титриметрическое определение можно выполнять с относительной погрешностью $\pm 0,2-0,3\%$ [16,17].

Задача валидации количественных титриметрических методик – убедиться в том, что результаты количественного определения получаются с необходимой точностью и прецизионностью и не выходят за регламентируемые допуски.

Для выполнения поставленной задачи применен один из эффективных методов титрования – метод стандарта – параллельное титрование стандартного вещества и исследуемого раствора из одной бюретки в одной и той же области объемов бюретки. Данный подход не описан в Фармакопеех, но его применение оправдано отсутствием в Руководстве [18] подходов к валидации таких методик.

Навеска стандартного вещества подбирается таким образом, чтобы она соответствовала номинальному объему титрования. Количество повторяемости анализа для определения титра и титрования исследуемого рас-

твора одинаково, т. к. это подчеркивает равноценность их вкладов в суммарную неопределенность методики. В таком варианте проведение титрования фактически ничем формально не отличается от проведения спектрофотометрического или хроматографического анализа методом стандарта [19].

Поэтому в методе стандарта, как в спектрофотометрии и хроматографии, нивелируются основные систематические погрешности: систематическая погрешность бюретки и температурный фактор. Кроме того, нивелируется и влияние холостого опыта. Остальные факторы в значительной степени переходят в случайные погрешности, которые можно уменьшить увеличением числа повторных анализов титрования.

Выводы

1. Изучена специфика метода определения аскорбиновой кислоты на основе окислительно-восстановительной реакции с 2,6-дихлорфенол-индофенолятом натрия (реактивом Тильманса).

2. Разработана и стандартизована методика определения аскорбиновой кислоты с использованием метода стандарта в витаминно-минеральном комплексе Gesticare для беременных.

3. Данный метод визуального титрования прост и легко воспроизводим, не занимает много времени и не требует никакого сложного оборудования.

Литература

1. Витамины во время беременности // Википедия: свободная энциклопедия. – Режим доступа: <http://ru.wikipedia.org/wiki/Энциклопедия>.
2. Гриффит В. Витамины, травы, минералы и пищевые добавки: Справочник / Гриффит В.; пер. с англ. К.Ткаченко. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 2000. – 1056 с.
3. Compendium 2010 – лекарственные препараты. Витамины. – Режим доступа: <http://www.compendium.com.ua/atc/A11>
4. Спиричев В.Б. Методы оценки витаминной обеспеченности населения: [учебно-метод. пособие] / Спиричев В.Б., Коденцова В.М., Вржесинская О.А. – М., 2001. – 68 с. (Материалы НИИ питания РАМН МЗ РФ).
5. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник. Изд-е 15-е, исправл., перераб. и доп. – М.: АстраФармСервис, 2009. – Режим доступа: <http://www.vidal.ru/spravochnik-vidal/>
6. Студеникин В.М. Поливитаминные препараты и витаминно-минеральные комплексы для беременных / В.М. Студеникин // Лечащий Врач. – 2007. – №4. – С. 63–65.
7. Эффективность применения витаминно-минеральных комплексов у беременных женщин / Никифоровский Н.К., Покусаева В.Н., Мельникова А.Б., Нечаевская И.В. // Мир витаминов. – 2009. – 07/05 – Режим доступа к журн.: <http://vitamins-world.info>.
8. Buzina R. Maternal Nutrition and Pregnancy Outcome / R. Buzina // Vitamin and Mineral in Pregnancy and Lactation – NY, 1988. – P. 1–3
9. Licensed Natural Health Products Database (LNHPD) Canada [Электронный ресурс]: база данных разрешенных натуральных продуктов – Режим доступа: <http://www.testcountry.org/vitamin-b-complex.htm>
10. Девис М. Витамин С: химия и биохимия / Девис М., Остин Дж., Татридж Д. – М.: Мир, 1999. – 176 с.
11. Фармацевтична енциклопедія / Гол.ред. ради В.П. Черних – 2-е вид. перероб. і доповн. – К.: МОРІОН, 2010. – 1632 с.
12. Химический энциклопедический словарь / Гл. ред. И.Л. Кнунянц. – М.: Сов. энциклопедия, 1983. – 792 с.
13. European Pharmacopoeia. – 6th ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2007. – 3308 p.
14. United States Pharmacopoeia 30 / National Formulary 25 (2007) United States Pharmacopoeia Convention. – Rockville, 2007.
15. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІПЕГ, 2001. – 556 с. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с. – Доповнення 2. – 2008. – 620 с. – Доповнення 3. – 2009. – 280 с.
16. Calibration of Burets and Pipets. – Chemistry 321L Manual. – P. 13–15.
17. Евтифеева О.А. Титриметрический метод анализа в условиях аптек и лабораторий по контролю качества лекарственных средств: проблемы и подходы / Евтифеева О.А., Георгианц В.А. // Фармаком. – 2008. – №2 – С. 65–77.
18. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна, М.А. Гетьмана, А.А. Малина. – М., 2007. – 58 с.
19. Гризодуб А.И. Стандартизованная процедура валидации количественных методик титрования лекарственных средств. / Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Чикалова С.О. и др. // ФАРМАКОМ. – 2007. – №3. – С. 8–11.

Сведения об авторах:

Левашова О.Л., аспирант каф. управления качества НФаУ.

Коваленко С.Н., д. хим. н., профессор, проректор по научной работе НФаУ, зав. каф. управления качества.

Адрес для переписки:

Левашова Ольга Леонидовна. 61058, г. Харьков, ул. Данилевского, 19/15.

Тел.: (057) 705 39 53, (099) 285 67 60.

E-mail: lev-26@list.ru