

## PHARMACY

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДИК  
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В СУБСТАНЦИИ**

Д. Т. Гаибназарова<sup>1</sup>, Г. У. Тиллаева<sup>2</sup>, Д. Б. Касимова<sup>3</sup>, У. М. Тиллаева<sup>4</sup>

<sup>1</sup>доц., к. фарм. н., доцент кафедры Стандартизации и менеджмента качества лекарственных средств Ташкентского фармацевтического института,

<sup>2</sup>проф., д. т. н., профессор кафедры Стандартизации и менеджмента качества лекарственных средств Ташкентского фармацевтического института,

<sup>3</sup>ассистент кафедры Фармацевтической химии Ташкентского фармацевтического института,

<sup>4</sup>к. фарм. н., старший преподаватель кафедры Фармацевтической химии, Узбекистан, Ташкент, Ташкентский фармацевтический институт

DOI: [https://doi.org/10.31435/rsglobal\\_wos/30112019/6806](https://doi.org/10.31435/rsglobal_wos/30112019/6806)

**ARTICLE INFO**

**Received:** 10 September 2019

**Accepted:** 19 November 2019

**Published:** 30 November 2019

**KEYWORDS**

ascorbic acid,  
quantification,  
HPLC,  
chromatography.

**ABSTRACT**

Increasing requirements for the safety, effectiveness and quality of medicines make it necessary to develop new and improve existing methods for their analysis. As a rule, the quality of substances is ensured by a set of analytical methods that confirm their authenticity, determine the purity and quantitative content of the active substance.

In this study, a comparative analysis of the physicochemical methods for the quantitative determination of ascorbic acid in substances is carried out. The advantage of using the method of high performance liquid chromatography over the spectrophotometric method is determined.

**Citation:** D. T. Gaibnazarova, G. U. Tillaeva, D. B. Kasimova, U. M. Tillaeva. (2019) Comparative Analysis of the Methods for the Quantitative Determination of Ascorbic acid in a Substance. *International Academy Journal Web of Scholar*. 11(41), Vol.1. doi: 10.31435/rsglobal\_wos/30112019/6806

**Copyright:** © 2019 D. T. Gaibnazarova, G. U. Tillaeva, D. B. Kasimova, U. M. Tillaeva. This is an open-access article distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License (CC BY)**. The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Введение.** Возрастающие требования к безопасности, эффективности и качеству лекарственных средств обуславливают необходимость разрабатывать новые и совершенствовать существующие методы их анализа. Как правило, качество субстанций обеспечивается комплексом аналитических методов, позволяющих подтвердить их подлинность, определить чистоту и количественное содержание действующего вещества. Используемые для этого методы и методики нуждаются в постоянном совершенствовании. Необходимо также учитывать сохраняющуюся проблему фальсификации лекарственных субстанций.

Учитывая вышеизложенное, актуальной является проблема сравнительного изучения физико-химических методов, используемых для анализа субстанций. Объектом исследования выбрана субстанция аскорбиновой кислоты, широко применяемая как активный фармакологический ингредиент в различных лекарственных формах.

**Цель и задачи исследования.** Целью исследования явилось сравнительное изучение методик количественного определения субстанций аскорбиновой кислоты как сквозной воспроизводимой методики. Анализ осуществляли сравнением двух методов (СФ, ВЭЖХ) с точки зрения надёжности методов анализа по показателю “Количественное определение”.

Аскорбиновая кислота – органическое соединение, которое необходимо для нормального функционирования соединительной и костной ткани. Является антиоксидантом и выполняет биологические функции восстановителя и кофермента некоторых метаболических процессов. Биологически активен только один из изомеров – *L*-аскорбиновая кислота, который называют витамином С. Аскорбиновая кислота – белый кристаллический порошок без запаха, кислого вкуса. Легко растворим в воде, растворим в спирте.  $t_{пл.}$  190-193°C (с разложением). Удельное вращение от +22° до +24° (2% водный раствор) [1].

**Экспериментальная часть.** Как известно, наличие сложных сопряженных систем в структуре аскорбиновой кислоты даёт возможность широкого применения УФ-спектрофотометрического метода для анализа. Так, IP, USP, EP (BP), ГФ и др. регламентируют при установлении подлинности сравнение УФ-спектров испытуемой субстанции со спектром стандартного образца [2].

В представленных методиках на стадии разведения и получения объема для измерения использовали два растворителя.

1. 0,10 г испытуемого образца растворяли в воде и немедленно доводили до объема 100,0 мл этим же растворителем. К 10 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной прибавляли 1,0 мл полученного раствора и доводили водой до объема 100,0 мл. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 243 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (Рис.1).

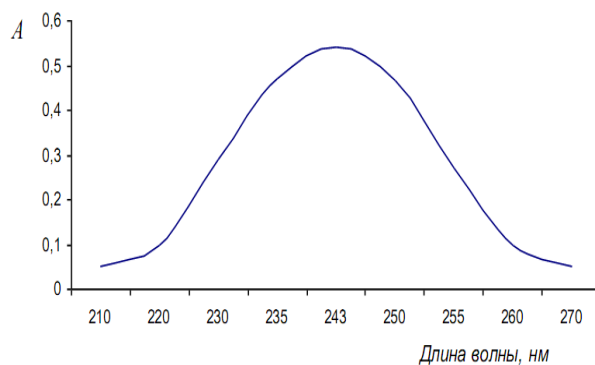


Рис. 1. УФ-спектр 0,001 % раствора кислоты аскорбиновой в 0,1 моль/л растворе кислоты хлористоводородной

Содержание аскорбиновой кислоты вычисляли по формуле:

$$C = \frac{A \cdot 100 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m_{\text{нав}}}$$

где,  $D$  - оптическая плотность испытуемого раствора;  $m_{\text{нав}}$  - масса действующего вещества в навеске, 0,10 г;  $E_{1\text{см}}^{1\%}$  — удельный показатель поглощения чистой аскорбиновой кислоты при длине волны 243 нм, равный 542,5.

2. 0,10 г испытуемого образца растворяли в воде и немедленно доводили до объема 100,0 мл этим же растворителем. К 10 мл 0,1 М раствора кислоты серной прибавляли 1,0 мл полученного раствора и доводили водой до объема 100,0 мл. Максимум поглощения: при 243 нм. Определение проводили немедленно после приготовления испытуемого раствора (рис.2).

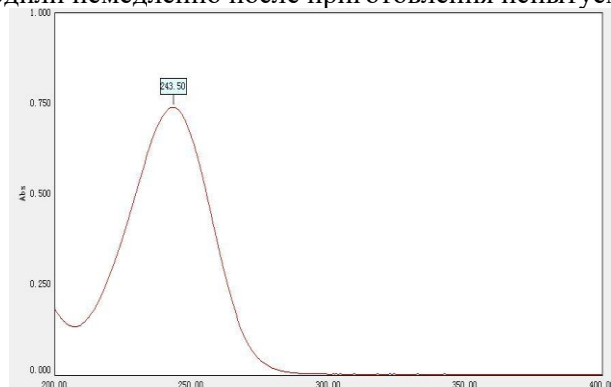


Рис. 2. УФ-спектр кислоты аскорбиновой (10 мкг/мл) в растворе кислоты серной. Содержание аскорбиновой кислоты в 1 мл раствора вычисляли по формуле:

$$C = \frac{A * 100 * 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} * m_{\text{нав}}}$$

где  $A$  — оптическая плотность испытуемого раствора;  $m_{\text{нав}}$  — масса действующего вещества в навеске, 0,10 г;  $E_{1\text{см}}^{1\%}$  — удельный показатель поглощения чистой аскорбиновой кислоты при длине волны 243,5 нм, равный 543.

Как видно, из рисунков 1,2 при применении раствора 0,1 моль/л серной кислоты, УФ-спектр образцов получается более чётким.

Результаты анализов аскорбиновой кислоты в субстанции с применением спектрофотометрического метода в различных растворителях приведены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты количественного анализа аскорбиновой кислоты в субстанции с применением спектрофотометрического метода в различных растворителях.

Опыт	Кислота аскорбиновая (в растворе 0,1 моль/л кислоты хлористоводородной)		Результаты	Кислота аскорбиновая (в растворе 0,1 моль/л кислоты серной)		Результаты
	удельный показатель поглощения	длина волны $\lambda$ , нм		С %	удельный показатель поглощения	
1	542,5	243 нм	98,96	560	243,5 нм	99,05
2	543,0	243 нм	99,02	560	243,5 нм	99,40
3	543,0	243 нм	98,90	555	243 нм	99,05
4	544,0	243 нм	99,08	555	243 нм	99,04

Сравнение результатов и некоторых метрологических характеристик методик определения количественного содержания аскорбиновой кислоты в субстанции (раствор в 0,1 моль/л хлористоводородной кислоте и раствор в 0,1 моль/л серной кислоте) спектрофотометрическим методом приводятся в табл.2.

Таблица 2. Сравнение результатов и некоторых метрологических характеристик методик определения количественного содержания аскорбиновой кислоты в субстанции (раствор в 0,1 моль/л хлористоводородной кислоте и раствор в 0,1 моль/л серной кислоте) спектрофотометрическим методом

Метод, № п/п	$\mu$	f	-x	S <sup>2</sup>	S	P	t(P,f) (таб.)	$\Delta x$	$\varepsilon$	F(P,f <sub>1</sub> ,f <sub>2</sub> ) (таб.) P-99%	F <sub>выч</sub>
1	100	3	98,99	0,006	0,077	95	3,16	0,243	0,24	29,46	0,019
2	100	3	99,13	0,031	0,17	95	3,16	0,54	0,54		

Из табл. 2 видно, что относительная ошибка метода количественного определения аскорбиновой кислоты спектрофотометрическим методом составила 0,24% (при добавлении в состав анализируемого раствора 0,1 моль/л хлористоводородной кислоты); и 0,54 % (при добавлении в состав анализируемого раствора 0,1 моль/л серной кислоты), что укладывается в пределы метода. Тем самым, необходимо отметить, что при добавлении в анализируемый раствор серную кислоту относительная ошибка методики уменьшается на достаточно существенное значение (0,3 %).

Анализ субстанции аскорбиновой кислоты при изучении метода ВЭЖХ использовали хроматограф. Условия хроматографирования следующее:

**Колонка:** C<sub>18</sub> из нержавеющей стали (25 см x 4.6 мм, размером частиц 5 мкм) или аналогичная.

**Детектор:** УФ 210 нм.

**Скорость потока:** Скорость потока 0,7 мл/мин.

**Температура термостата колонки:** 60°C ± 2°C

**Объём введения:** 20 мкл

**Буфер:** 4,55 г калия дигидрофосфата растворяли в 1000 мл очищенной воды при перемешивании. pH полученного раствора довели до значения 7,5 с помощью 10% раствора натрия гидроксида и перемешивали.

**Подвижная фаза:** ацетонитрил – 0,1 М, ацетат аммония – 0,002 М ацетат натрия (60:20:20, об/об).

**Приготовление раствора РСО.**

Подлинность азитромицина устанавливали по времени удерживания. Результаты приведены на рисунках 3 и 4.

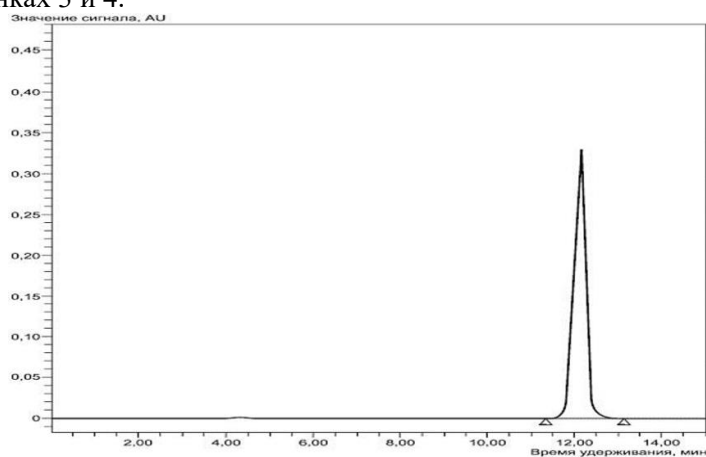


Рис. 3. Хроматограмма стандартного раствора аскорбиновой кислоты (время удерживания – 12,102 мин).

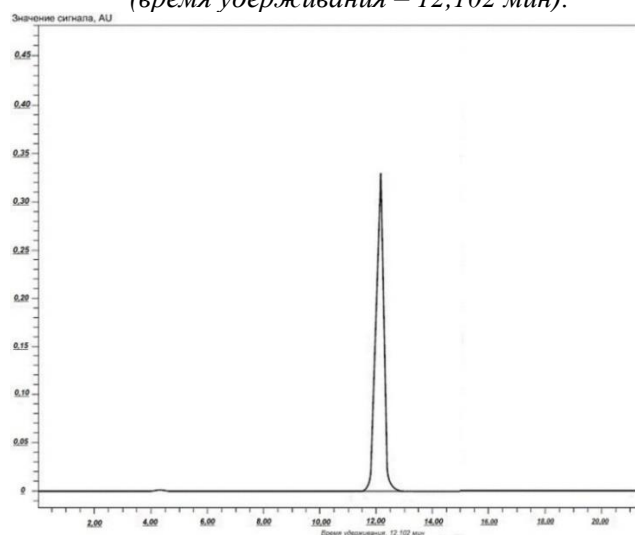


Рис. 4. Хроматограмма раствора субстанции аскорбиновой кислоты (время удерживания – 12,102 мин).

Из рис. 3 и 4 видно, что время удерживания раствора стандартного образца аскорбиновой кислоты и анализируемой аскорбиновой кислоты одинаковы (12,102 мин).

Таблица 3. Результаты определения количественного содержания аскорбиновой кислоты в субстанции с применением ВЭЖХ в двух растворителях

Опыты	Субстанция кислоты аскорбиновой (в растворе 0,1 моль/л кислоты хлористоводородной), %	Результаты статистической обработки данных анализа	Субстанция кислоты аскорбиновой (в растворе 0,1 моль/л кислоты серной), %	Результаты статистической обработки данных анализа
1	98,96	$X_{\text{ср}} = 98,99$	99,05	$X_{\text{ср}} = 99,13$
2	99,02	$S_2 = 0,006$	99,40	$S_2 = 0,0031$
3	98,90	$S = 0,077$	99,05	$S = 0,17$
4	99,08	$\Delta X = 0,243$ $\Delta X_{\text{ср}} = 0,11$ $\varepsilon = 0,24\%$ $\varepsilon_{\text{ср}} = 0,11\%$	99,04	$\Delta X = 0,54$ $\Delta X_{\text{ср}} = 0,005$ $\varepsilon = 0,54\%$ $\varepsilon_{\text{ср}} = 0,24\%$

Из табл. 3 видно, относительная ошибка методики ВЭЖХ количественного определения аскорбиновой кислоты составило 0,24%, что укладывается в пределы метода.

Сравнение результатов и некоторых метрологических характеристик методик определения количественного содержания аскорбиновой кислоты в субстанции (раствор в 0,1 моль/л хлористоводородной кислоте и раствор в 0,1 моль/л серной кислоте) ВЭЖХ методом приводятся в табл. 4.

Таблица 4. Сравнение данных ВЭЖХ методики анализа субстанции аскорбиновой кислоты в различных растворителях (раствор в 0,1 моль/л хлористоводородной кислоте и раствор в 0,1 моль/л серной кислоте)

Метод, № п/п	$\mu$	f	-x	$S_2$	S	P	t(P,f) (табл.)	$\Delta x$	$\varepsilon$	F(P,f <sub>1</sub> ,f <sub>2</sub> ) (таб.) P-95%	F <sub>выч</sub>
1	100	3	99,96	0,0002	0,014	95	3,16	0,044	0,04	29,46	0,0066
2	100	3	99,92	0,033	0,18	95	3,16	0,57	0,57		

Из табл. 3 видно, относительная ошибка метода количественного определения аскорбиновой кислоты спектрофотометрическим методом составила 0,11% (при добавлении в состав анализируемого раствора 0,1 моль/л хлористоводородной кислоты); и 0,24 % (при добавлении в состав анализируемого раствора 0,1 моль/л серной кислоты), что укладывается в пределы метода. Тем самым, нужно отметить, что при добавлении в анализируемый раствор серную кислоту относительная ошибка методики уменьшается на незначительное значение (0,13 %).

Для сравнения двух методов анализа результаты подвергли статистической обработке и свели в табл.5.

Таблица 5. Данные для сравнительной метрологической оценки СФ и ВЭЖХ методик количественного определения аскорбиновой кислоты в субстанции

Метод, № п/п	$\mu$	f	-x	$S^2$	S	P	t(P,f) (табл.)	$\Delta x$	$\varepsilon$	F(P,f <sub>1</sub> ,f <sub>2</sub> ) (таб.) P-99%	F <sub>выч</sub>
СФ	100	3	99,06	0,0185	0,1235	95	3,16	0,3915	0,39	29,46	0,93
ВЭЖХ	100	3	99,94	0,0166	0,097	95	3,16	0,307	0,30		

Из таблицы 5 видно, что при P=95% гипотезу о различии дисперсий  $S_1^2$  и  $S_2^2$  следует признать статистически достоверной. Относительная ошибка методики количественного определения аскорбиновой кислоты ВЭЖХ методом низка, что указывает на высокую точность метода по отношению к спектрофотометрии.

**Выводы.** 1.Проведён анализ состояния методов стандартизации и контроля качества субстанции аскорбиновой кислоты, включая международные программы и зарубежные фармакопеи.

2. Проведён анализ и рассчитаны некоторые метрологические характеристики методики количественного определения аскорбиновой кислоты в субстанции методом УФ-спектрофотометрии. Отмечена относительно низкая относительная погрешность методики (0,24%), где использовалась смесь растворителей с добавлением 0,1 моль/л хлористоводородной кислоты.

3. Проведён анализ количественного содержания аскорбиновой кислоты в субстанции методом ВЭЖХ. Отмечена относительно низкая относительная погрешность методики (0,11%), где использовалась смесь растворителей с добавлением 0,1 моль/л хлористоводородной кислоты.

4. Проведено сравнение методик количественного определения с применением ВЭЖХ и СФ методов субстанции аскорбиновой кислоты по критерию Фишера:

а) результаты, полученные первым методом (СФ), являются правильными, т.е. они не отягощены систематической ошибкой;

б) результаты, полученные вторым методом, отягощены систематической ошибкой (ВЭЖХ);

с) по воспроизводимости второй метод (ВЭЖХ) существенно лучше первого метода.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. / М.Д. Машковский. 18-е изд., перераб. и доп. – М.: Новая волна, 2010. – 1234 с.
2. Cartwright A. C. International Harmonisation of Pharmacopoeias //The British Pharmacopoeia, 1864 to 2014. – Routledge, 2016. – С. 173-184.
3. Ся Ю., Дорофеев В. Л. Использование УФ-спектрофотометрии для количественного определения водорастворимых витаминов в лекарственных препаратах //Фармация. – 2010. – №. 7. – С. 14-16.