

URSZULA HACHUŁA, BEATA ZAWISZA, WANDA WINKLER

ZASTOSOWANIE METODY
CHROMATOGRAFICZNO-SPEKTROFOTOMETRYCZNEJ DO
ANALITYCZNEJ KONTROLI KWASU L-ASKORBINOWEGO
W MATERIALE FARMACEUTYCZNYM I ROŚLINNYM

APPLICATION OF THE CHROMATOGRAPHIC - SPECTROFOTOMETRIC
METHOD FOR ANALYTICAL CONTROL OF L-ASCORBIC ACID IN
PHARMACEUTICAL AND PLANT MATERIAL

Zakład Chemii Analitycznej
Uniwersytet Śląski
40-006 Katowice, ul. Szkolna 9
Kierownik: prof dr hab. F. Buhl

Przedstawiono sposób analitycznego postępowania zmierzający do oceny trwałości witaminy C w preparacie farmaceutycznym oraz do oszacowania ubytku kwasu L-askorbinowego w natce pietruszki i lubczyka podczas ich suszenia i przechowywania. Opracowano warunki chromatograficznej izolacji kwasu L-askorbinowego z badanych materiałów, a do ilościowej oceny zastosowano metodę ekstrakcyjno-spektrofotometryczną.

WSTĘP

Witaminy są związkami organicznymi pełniącymi rolę regulatorów i katalizatorów przemiany materii. Organizm człowieka nie ma zdolności ich syntetyzowania i z uwagi na to, mają one szerokie zastosowanie w leczeniu, jak również podawane są zapobiegawczo w postaci środków farmaceutycznych oraz są ważnym składnikiem żywności.

Witamina C ma istotne znaczenie dla funkcjonowania organizmu człowieka. Formą biologicznie aktywną jest zarówno kwas L-askorbinowy jak również odwodorowana forma tego związku – kwas dehydroaskorbinowy. W obecności tlenu obie formy ulegają nieodwracalnemu utlenianiu do produktów nie wykazujących aktywności biologicznej. Tę reakcję utleniania witaminy C katalizuje enzym oksydaza askorbinianowa, która jest obecna w tkankach roślinnych. Układ redoks kwas askorbinowy – kwas dehydroaskorbinowy między innymi pełni znaczącą funkcję w zachowaniu odpowiedniego potencjału oksydoredukcyjnego w komórce i bierze udział w transporcie elektronów jak również uczestniczy w hydroksylacji związków aromatycznych. Procesy te są ściśle związane z określonym stężeniem kwasu askorbinowego. Zapotrzebowanie dzienne organizmu człowieka (średnio 50–75 mg) jest pokrywane głównie przez spożywanie produktów owocowych i warzywnych. Z uwagi na niestabilność kwasu L-askorbinowego związaną z jego właściwościami redoks istotnym problemem jest możliwość oceny trwałości tej

substancji czynnej w preparatach farmaceutycznych oraz żywieniowych podczas ich przechowywania i obróbki technologicznej [1–8].

W prezentowanej pracy przedstawiono procedurę analityczną pozwalającą na kontrolę trwałości witaminy C w złożonym preparacie farmaceutycznym oraz podjęto próbę oceny ubytku kwasu L-askorbinowego w natce pietruszki i lubczyka podczas ich przechowywania i suszenia. Rozkład kwasu L-askorbinowego zamierzono śledzić po wstępnej izolacji z badanego materiału wykorzystując technikę chromatografii cienkowarstwowej. Dla ilościowej oceny tego procesu zaproponowano metodę ekstrakcyjno-spektrofotometryczną wykorzystującą sprzężone reakcje redokso-kompleksowe przebiegające w układzie: Fe (III), 1,10-fenantrolina, błękit bromofenolowy [9].

MATERIAŁY I METODYKA

Odczynniki i roztwory:

1) Roztwór wzorcowy kwasu L-askorbinowego o stężeniu 1 mg/ml 0,1 g preparatu cz.d.a. (Polfa) Kraków rozpuszczono w wodzie redestylowanej i rozcieńczano do objętości 100 ml, stężenie roztworu oznaczano jodometrycznie [10]. 2) Roztwory robocze o stężeniu 100 i 10 g/ml uzyskano przez odpowiednie rozcieńczenia roztworu wzorcowego wodą redestylowaną. 3) Roztwór Fe (III) o stężeniu 1 mg/ml otrzymano przez rozpuszczenie 8,6350 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ w wodzie redestylowanej z dodatkiem 5 ml stężonego H_2SO_4 i uzupełniono roztwór wodą redestylowaną do 1 l. 4) Roztwór Fe (III) o stężeniu 100 g/ml otrzymano przez rozcieńczenie roztworu Fe (III) o stężeniu 1 mg/ml roztworem 0,005 M H_2SO_4 . 5) Roztwór 1,10-fenantroliny 0,01 M: rozpuszczono 1,9882 g związku w 1 l gorącej wody redestylowanej. 6) Błękit bromofenolowy 0,001 M roztwór rozpuszczono 0,67 g związku w 1 l gorącej wody redestylowanej.

Aparatura:

1. Spektrofotometry Specol i Spekord UV-VIS (Zeiss, Jena Niemcy), kuwety o grubości 1 cm.
2. Pehametr N 517 (Mera-Elwro-Wrocław)
3. Zestaw do chromatografii firmy Camag. Płytki chromatograficzne firmy Merck (Niemcy).
4. Suszarka laboratoryjna KBC (Premed Warszawa)

Ocena trwałości witaminy C w preparacie wielowitaminowym „Vitalar”

Skład drażetki:

witaminy: A = 4000 jm; B₁ = 1 mg; B₂ = 2 mg; B₆ = 0,125 mg; PP = 10 mg; C = 30 mg; D₃ = 1000 jm; E = 0,25 mg; kwas foliowy 0,2 mg; rutyna 5,0 mg

Rozdzielanie chromatograficzne:

Do rozdzielania witaminy C (tj. kwas L-askorbinowy i kwas dehydroaskorbinowy) w preparatach farmaceutycznych znalazły zastosowanie układy chromatografii cienkowarstwowej [11]. Prace doświadczalne dotyczyły doboru układu rozwijającego oraz nośnika. Najlepszy rozdział kwasu L-askorbinowego od jego produktów rozkładu i innych składników farmaceutyku uzyskano dla warunków:

1. faza ruchoma: kwas octowy lodowaty : aceton : metanol : benzen (1 : 1 : 4 : 14).
2. faza stacjonarna: płytki chromatograficzne pokryte żelazem krzemionkowym impregnowane 0,5 % roztworem wersenianu disodowego.
3. wywoływacz: Fe (III), 2,2'-dipirydyl

Przygotowanie krzywej wzorcowej:

Na zaktywowane płytki chromatograficzne наносzono kwas L-askorbinowy w przedziale stężeń od 2–10 g. Płytki rozwijano w ustalonych warunkach chromatograficznych. Po wysuszeniu płytki żel z powierzchni plamek charakterystycznych dla kwasu L-askorbinowego zdejmowano i eluowano porcjami wody (3–1 ml) do probówek wirówkowych. Po odwirowaniu otrzymany roztwór z nad osadu posłużył do oznaczeń metodą ekstrakcyjno-spektrofotometryczną, a próby przygotowywano następująco:

- do kolbek o pojemności 10 ml wprowadzono 25 μg Fe (III), roztwór kwasu L-askorbinowego (przygotowany jak wyżej), pH = 2,3, próbki pozostawiono na 5 minut. Dodawano 2 ml 0,01 M roztworu 1,10-fenantroliny, a po 10 minutach wprowadzono 2,5 ml 0,001 M roztworu błękitu bromofenylowego i dopełniano do 10 ml buforem boranowym o pH = 8,9. Całość przenoszono do rozdzielacza i ekstrahowano 10 ml mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamyłowego (4 : 1) przez 1,5 minuty. Po rozdzieleniu faz ekstrakt oddzielano i uzupełniano do 10 ml bezwodnym etanolem.

Roztwór odniesienia przygotowywano tak samo jak próbę z tą różnicą, że z płytki zdejmowano żel z powierzchni odpowiadającej powierzchni zajmowanej przez plamkę, ale bez niej. Absorbancję organicznych ekstraktów mierzono przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 610$ nm wobec roztworu odniesienia w kuwetach o grubości 1 cm.

Wykonanie oznaczenia:

Przygotowanie ekstraktu wodnego z drażetki przeprowadzono w następujący sposób:

- po dokładnym roztarciu drażetki przeprowadzono ekstrakcję wodą, odwirowywano i dopełniano do objętości 10 ml. Następnie nakładano na płytkę chromatograficzną 20 μl ekstraktu. Po rozwinięciu w opisanych warunkach chromatograficznych żel z powierzchni plamki charakterystycznej dla kwasu L-askorbinowego ($R_F = 0,20$) zdejmowano i eluowano wodą porcjami do kolby o pojemności 25 ml, a następnie odwirowywano. Roztwór ten posłużył do analizy metodą ekstrakcyjno-spektrofotometryczną. Próby do oznaczeń spektrofotometrycznych przygotowywano tak jak przy sporządzaniu prób do krzywej wzorcowej pobierając do analizy 2,5 ml roztworu kwasu L-askorbinowego otrzymanego po izolacji chromatograficznej.

Pomiary absorbancji organicznych ekstraktów wykonywano przy $\lambda_{\text{max}} = 610$ nm wobec roztworu odniesienia. Wyniki oznaczeń odczytywano z krzywej wzorcowej po rozdzieleniu chromatograficznym.

Ocena ubytku kwasu L-askorbinowego w natce pietruszki i lubczyka podczas ich suszenia i przechowywania

Rozdzielanie chromatograficzne

Ustalono następujące warunki rozdzielania:

1. faza rozwijająca: lodowaty kwas octowy : aceton : metanol : benzen : n-butanol (1 : 1 : 4 : 14 : 6).
2. płytki chromatograficzne pokryte żelą krzemionkowym impregnowane 0,5 % roztworem wersenianu disodowego.
3. wywoływacz: Fe (III), 2,2'-dipirydył

Przygotowanie krzywej wzorcowej:

Postępowano analogicznie jak przy sporządzaniu krzywej wzorcowej dotyczącej analizy preparatu farmaceutycznego jednakże etap rozdzielania chromatograficznego był przeprowadzony w ustalonych powyżej warunkach chromatograficznych.

Wykonanie oznaczenia:

Próby do oznaczeń przygotowano w następujący sposób:

- po dokładnym rozruci odpowiedniej naważki natki pietruszki lub lubczyka w moździerzu, miążgę ilościowo przenoszono do próbki wirówkowej i dodawano 4 ml 2 % roztworu kwasu szczawiowego. Całość mieszano i pozostawiano w ciemnym miejscu na 30 minut. Ekstrakcję 2 % roztworem kwasu szczawiowego przeprowadzano jeszcze dwa razy, a roztwór po odwirowaniu przenoszono do kolby na 25 ml. Roztwór ten służył do analizy chromatograficzno-spektrofotometrycznej.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Oznaczano kwas L-askorbinowy w drażetkach „Vitalal”. Ze względu na substancje towarzyszące i ewentualne produkty rozkładu zaproponowano wstępną ekstrakcję wodą, a z otrzymanego wyciągu wodnego izolowano kwas L-askorbinowy na drodze chromatografii cienkowsarstwowej w ustalonych doświadczalnie warunkach i oznaczano metodą ekstrakcyjno – chromatograficzną. Uzyskane wyniki wraz z oceną statystyczną przedstawiono w tabeli I. Podany sposób analitycznego postępowania jest odpowiedni do badania zgodności produktu z deklaracją producenta.

Tabela I. Oznaczanie kwasu L-askorbinowego w drażetkach „Vitalal”
The determination of L-ascorbic acid in „Vitalal” dragees

Nr serii	Zawartość [mg]		S _r [%]	± t _{0,95} x \bar{s}
	deklarowana witaminy C	Oznaczona kw. L-ask.		
1	30	27,70	1,66	0,48
2	30	27,30	1,90	0,55
3	30	27,30	1,94	0,56

Opisaną procedurę analityczną zastosowano do szacowania ubytku kwasu L-askorbinowego w natce pietruszki i lubczyka podczas ich przechowywania i suszenia. Sporządzone ekstrakty witaminy C do kwasu szczawiowego stanowiły przedmiot analizy chromatograficznej cienkowsarstwowej w ustalonych warunkach. Wyizolowany kwas L-askorbinowy oznaczano metodą ekstrakcyjno-spektrofotometryczną, a otrzymane rezultaty przedstawiono w tabelach II–V. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że ubytek kwasu L-askorbinowego zawartego w badanym materiale roślinnym w znacznym stopniu zależy od sposobu, czasu oraz temperatury przechowywania i suszenia. Zaobserwowano, że najmniejsze straty kwasu L-askorbinowego występują w warunkach ograniczonego dostępu powietrza, nawet w podwyższonej temperaturze. Kwas L-askorbinowy zawarty w badanych preparatach jest również dość odporny na światło. Działanie podwyższonej temperatury przy ograniczonym dostępie powietrza nie wpływa na rozkład tej substancji.

Tabela II. Zawartość witaminy C w natce pietruszki suszonej na świetle w temp. pokojowej z dostępem powietrza
Vitamin C content in the parsley air dried in light in the room temperature

Czas suszenia	Ilość kw. L-ask. [mg/100 g]	Ubytek kw. L-ask. [%]
1 tydzień	91,47	48,5
3 tygodnie	57,73	67,5
4 tygodnie	48,85	72,5
8 tygodni	44,40	75,0
6 miesięcy	42,80	75,9

Świeży produkt zawierał 177,62 mg kwasu L-askorbinowego/100 g produktu.
(The fresh product contained 177,62 mg of L-ascorbic acid in 100 g of the product)

Tabela III. Zawartość witaminy C w natce pietruszki suszonej bez dostępu światła, w temperaturze pokojowej z dostępem powietrza
Vitamin C content in the parsley air dried without light in the room temperature

Czas suszenia	Ilość kw. L-ask. [mg/100 g]	Ubytek kw. L-ask. [%]
1 tydzień	84,37	52,5
3 tygodnie	55,95	68,5
6 miesięcy	43,16	75,7

Świeży produkt zawierał 177,62 mg kwasu L-askorbinowego/100 g produktu.
The fresh product contained 177,62 mg of L-ascorbic acid in 100 g of the product

Tabela IV. Zawartość witaminy C w natce pietruszki suszonej bez dostępu światła, w temp. 60°C, z ograniczonym dostępem powietrza
Vitamin C content in the parsley dried without light in the temperature of 60°C with the limited access of air

Czas suszenia [tygodnie]	Ilość kw. L-ask. [mg/100 g]	Ubytek kw. L-ask. [%]
1	135,88	23,5
2	121,14	31,8

Świeży produkt zawierał 177,62 mg kwasu L-askorbinowego/100 g produktu
The fresh product contained 177,62 mg of L-ascorbic acid in 100 g of the product

Tabela V. Ubytek kwasu L-askorbinowego podczas suszenia lubczyka w różnych warunkach przez 1 tydzień.
L-ascorbic acid decrement during the drying of the lovage in different conditions in 1 week times

Sposób suszenia	Ilość kw. L-ask. [mg/100 g]	Ubytek kw. L-ask. [%]
z dostępem światła i powietrza, temp. 20°C	53,54	46,3
bez dostępu światła, z ograniczonym dostępem powietrza, temp. 20°C	79,96	19,8
bez dostępu światła, z ograniczonym dostępem powietrza, temp. 100°C	72,18	27,6

Świeży produkt zawierał 99,70 mg kwasu L-askorbinowego/100 g produktu
(The fresh product contained 99,70 mg of L-ascorbic acid in 100 g of the product)

WNIOSKI

1. Przedstawione metody chromatograficznego rozdzielania umożliwiają dobrą izolację kwasu L-askorbinowego od jego produktów rozkładu oraz innych substancji towarzyszących mu w badanym preparacie farmaceutycznym i preparatach roślinnych.
2. Połączenie metody chromatograficznego rozdzielania z czułą metodą analityczną umożliwia pracę z próbką rzędu 1 µg kwasu askorbinowego/ml (zakres prostoliniowości krzywej wzorcowej po rozdziale chromatograficznym obejmuje przedział od 0,2 do 1 µg/ml; $\epsilon = 1,2 \times 10^5$).
3. Zaproponowane sposoby analitycznego postępowania pozwoliły na ocenę trwałości witaminy C w preparacie wielowitaminowym „Vitalal”, oraz oszacowanie ubytku kwasu L-askorbinowego w natce pietruszki i lubczyka podczas ich suszenia i przechowywania.
4. Kwas L-askorbinowy zawarty w natce pietruszki i lubczyka jest dość odporny na światło i działanie podwyższonej temperatury (przy ograniczonym dostępie powietrza). Najważniejszym czynnikiem powodującym ubytek kwasu L-askorbinowego jest tlen zawarty w powietrzu.

U. Hachuła, B. Zawisza, W. Winkler

APPLICATION OF THE CHROMATOGRAPHIC – SPECTROFOTOMETRIC METHOD FOR ANALYTICAL CONTROL OF L-ASCORBIC ACID IN PHARMACEUTICAL AND PLANT MATERIAL

Summary

The conditions of chromatographic separation allowing the isolation of L-ascorbic acid from its products of decomposition and other accompanying substances in the determined pharmaceutical preparation and plant materials were established.

The isolated L-ascorbic acid was signed by the extractive – spectrophotometric method using coupled redox-complexation reactions with iron(III), 1, 10 phenantroline and bromophenol blue system.

The analytical procedure allowing the evaluation of durability of vitamin C in multivitamin „Vitalar” preparate was described.

The procedure was used also for the evaluation of the loss of L-ascorbic acid in the parsley and lovage in the process of drying and storage.

PIŚMIENNICTWO

1. *Nadolna I., Secomska B.*: Zmiany zawartości witaminy C zachodzące podczas przygotowywania i przetrzymywania potraw. Roczn. PZH 1980, 31, 503–508.
2. *Just B., Pawłowski W.*: Kulometryczna metoda w analizie suchych produktów roślinnych. I. Oznaczanie wilgotności wobec kwasu askorbinowego. Chem. Anal. 1985, 30, 803–811.
3. *Nadolna J.*: Witamina C w: Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej żywności. ed. Rutkowska U., PZWL, Warszawa 1981, 291–300.
4. *Ładoński W., Gospodarek T.*: Podstawowe metody analityczne produktów żywnościowych. PWN, Warszawa-Wrocław 1986, 223–226.
5. *Ciesielski W.*: Spektrofotometryczne równoczesne oznaczanie cysteiny, glutationu i kwasu askorbinowego z wykorzystaniem indukowanej reakcji jodo-azydkowej. Chem. Anal. 1986, 31, 99–103.
6. *Buhl F., Mikula B.*: Spektrofotometryczne oznaczanie kwasu askorbinowego z wykorzystaniem układów potrójnych. Chem. Anal. 1988, 33, 103–109.
7. *Czerwiecki L., Wilczyńska G.*: Oznaczanie witaminy C w wybranych produktach owocowo-warzywnych. Roczn. PZH 1999, 50, 77–87.
8. *Rzeszutko W., Somogyi E., Woltyńska H.*: Application of copper (II) chloride to indirect iodometric determination of the ascorbic acid in selected pharmaceuticals. Acta Polon. Pharm. 1996, 53, 79–80.
9. *Buhl F., Mikula B.*: Jonowe asocjaty kationowych kompleksów chelatowych amin heterocyklicznych z niechelatującymi barwnikami sulfoftaleinowymi. II. Ekstrakcyjno-spektrofotometryczne oznaczanie żelaza. Chem. Anal. 1984, 29, 343–353.
10. Farmakopea Polska IV, t. 1, PZWL Warszawa 1965, 107–109.
11. *Pączek K.*: Witamina C w: Chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej ed. Borkowski B., PZWL, Warszawa 1973, 266–267.

Otrzymano: 1999.07.21