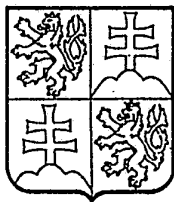


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATÍVNA
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

273 053

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 07 C 403/00
C 07 G 13/00

(21) PV 3680-88.B

(22) Prihlásené 30 05 88

(40) Zverejnené 12 07 90

(45) Vydané 30 03 92

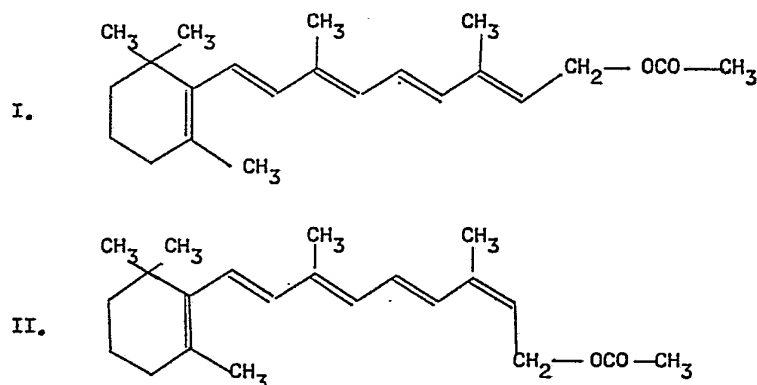
(75) Autor vynálezu ŠRANK ANDREJ Pharm. dr., PIEŠŤANY, POLHORSKÁ
MIROSLAVA Pharm. dr., SEREĎ, MICHALÁK KAROL RNDr.,
ČAKAJOVCE, LUKAČOVIČOVÁ ANNA ing., ŠIŠKA KAROL ing.,
KARABINOŠOVÁ EVA ing., KARABINOS JOZEF ing.,
HLOHOVEC

(54)

Sekundárny externý štandard pre stanovenie
obsahu octanu vitamínu A

(57) Riešenie sa týka použitia 2,6-diterc-
butyl-4-metylfenolu ako sekundárneho
externého štandardu pri stanovení octanu
vitamínu A, zohľadňujúc ich biologickú
účinnosť, vo forme koncentráту i sypkých
hmôt metódou kvapalinovej chromatografie
na silikagéli s chemicky viazanými
oktadecylovými skupinami.

Vynález sa týka použitia 2,6-ditercbutyl-4-metylphenolu pre stanovenie obsahu octanu vitamínu A vzorcov I. a II. zohľadňujúce biologickú účinnosť jednotlivých izomérov metódou kvapalinovej chromatografie na silikagéli s chemicky viazanými oktadecylovými skupinami.



Na stanovenie obsahu octanu vitamínu A sa doteraz používa spektrofotometrická metóda, ktorá nie je dostatočne selektívna. Prítomnosť balastných látok absorbujúcich v oblasti 320 až 330 nm ruší presnosť a správnosť výsledkov /Knobloch E., Fyzikálne chemické metódy stanovenia vitamínů, 1956/. Oddelenie týchto balastných látok čiastočne rieši CS AO 246254 sorpciou na stípci Al_2O_3 .

Viacerí autori sa zaoberali plynovo-chromatografickou metódou stanovenia obsahu vitamínu A. Vecchi M. a spol. /J. Chrom. 83, 1973, 447-453/ zistili, že metóda nie je uspokojivá. Nepodarilo sa úplne separovať jednotlivé izoméry, vzorku treba pred nástrekom upravovať zmydlením a následnou silyláciou, v injekčnom priestore chromatografu nastáva čiastočná reizomerizácia vzorky.

Vecchi a spol. analyzovali octan vitamínu A bez predchádzajúcej úpravy vzorky zmydlením metódou kvapalinovej chromatografie v systéme s normálnymi fázami s použitím naftalénu a etylbenzoátu ako interného štandardu. Lukačovičová a Karabinošová analyzovali octan vitamínu A v systéme s reverznými fázami s použitím kryštalického vitamínu A acetátu ako štandardu (CS AO 260286). Nebrala sa však do úvahy biologická účinnosť jednotlivých izomérov a presnosť stanovenia je ovplyvnená nestabilitou použitého štandardu.

Nevýhodou týchto postupov je zložitá úprava vzorky. Ďalej hlavne nepresnosť stanovenia spôsobená pri spektrofotometrických postupoch prítomnosťou balastných látok a pri použití chromatografického delenia nestabilitou externého štandardu a nezohľadňovaním biologickej účinnosti jednotlivých izomérov.

Uvedené nedostatky odstraňuje použitie 2,6-ditercbutyl-4-metylphenolu ako sekundárneho externého štandardu, ktorý je bežne dostupný a používa sa hlavne ako antioxidačný stabilizátor (M. Mandák a kol., Liekové formy, 1985).

Pri hľadaní vhodného sekundárneho externého štandardu na stanovenie obsahu octanu vitamínu A sme s prekvapením zistili, že 2,6-ditercbutyl-4-metylphenol má v danom chromatografickom systéme podobnú pohyblivosť ako octan vitamínu A, pričom má veľmi dobré rozlíšenie od všetkých zložiek a v použitej koncentrácii je spektrálne detegovateľný.

Navrhovaná metóda stanovenia octanu vitamínu A chromatografiou na stípci s silikagélom s chemicky viazanými oktadecylovými skupinami a použitím sekundárneho externého štandardu 2,6-ditercbutyl-4-metylphenolu, zohľadňujúca biologickú účinnosť jednotlivých izomérov dáva dosiaľ najpresnejší obraz o biologickej účinnosti vitamínu A vo

forme koncentrátnu octanu vitamínu A i v sypkých formách octanu vitamínu A. Vynález sa výhodne využije pri stanovení vitamínu A v chemicko-farmaceutickom priemysle.

Postup podľa vynálezu je objasnený na príkladoch prevedenia bez toho, že by tieto obmedzovali predmet vynálezu.

Príklad 1

Stanovenie responzného faktora

Roztok sekundárneho externého štandardu:

Do odmernej banky na 25 ml sa naváži 0,12 g bezfarebného kryštalického 2,6-ditercbutyl-4-metylfenolu, rozpustí sa v izopropanole a doplní sa izopropanolom po značku, používa sa vždy čerstvo pripravený.

Roztok kryštalického vitamínu A:

Do 25 ml odmernej banky sa naváži asi 0,025 g kryštalického octanu vitamínu A, rozpustí sa pretrepaním v izopropanole a doplní sa izopropanolom po značku. Z tohoto roztoku sa odpipetuje 1 ml do 50 ml odmernej banky a doplní sa po značku izopropanolom.

Postup: Do kvapalinového chromatografu sa nastrekne po 3x roztok sekundárneho externého štandardu a roztok kryštalického octanu vitamínu A. Z priemerných hodnôt plôch sa vypočíta responzný faktor:

$$R_f = \frac{P_a \cdot n_{st}}{P_{st} \cdot n_a}$$

P_a = plocha píku kryštalického octanu vitamínu A

P_{st} = plocha píku sekundárneho externého štandardu

n_a = návažok kryštalického octanu vitamínu A v g

n_{st} = návažok sekundárneho externého štandardu v g

Roztok vzorky:

Do 100 ml odmernej banky sa naváži asi 0,150 g vzorky octanu vitamínu A vo forme sypkej hmoty, pridá sa 2 ml vody a nechá sa rozpustiť v ultrazvukovej kúpeli. Banka sa po ochladení doplní izopropanolom, pretrepe. Roztok sa prefiltruje cez filtračný papier a z filtrátu sa pipetuje 2,0 ml do 25 ml odmernej banky a doplní sa izopropanolom po značku.

Vlastné stanovenie: Do kvapalinového chromatografu sa nastrekne po 2x roztok vzorky a roztok sekundárneho externého štandardu.

$$x = \frac{P_{vz} \cdot n_{st} \cdot q}{P_{st} \cdot n_{vz} \cdot R_f}$$

Obsah 13-cis izoméru v m.j./g sa vypočíta:

$$y = \frac{P_{vz} \cdot n_{st} \cdot q}{P_{st} \cdot n_{vz} \cdot R_f} \cdot 1,089 \cdot 0,819$$

Celkový obsah octanu vitamínu A v m.j./g sa vypočíta: $z = x + y$

P_{vz} = plocha píku vzorky

P_{st} = plocha píku sekundárneho externého štandardu

n_{vz} = návažok vzorky v g

n_{st} = návažok sekundárneho externého štandardu v g

q = obsah kryštalického octanu vitamínu A v m.j./g, stanovený podľa ČsL

R_f = responzný faktor

1,089 = prepočítavací faktor na 13-cis izomér /Stenerle H., J.Chrom., 206, 1981, 2, 319-326/

0,819 = účinnosť 13-cis izoméru vzhľadom na all-trans izomér /Knobloch E., Pokroky ve farmácii 2, 1980, 242/

Podmienky chromatografického stanovenia:

Kolóna: Lichrosorb RP - 18,7 μ m

Mobilná fáza: acetonitril - voda : 83-17

Prietok: 1,80 ml/min

Detekcia: 300 nm /sekundárny externý štandard, / 325 nm / octan vitamínu A/

Citlivosť detektora: 0,32 AUFS

Nástrek: Rheodyne naľave 20 μ l

Retenčný čas all-trans izoméru : cca 12 min.

Retenčný čas 13-cis izoméru : cca 11 min.

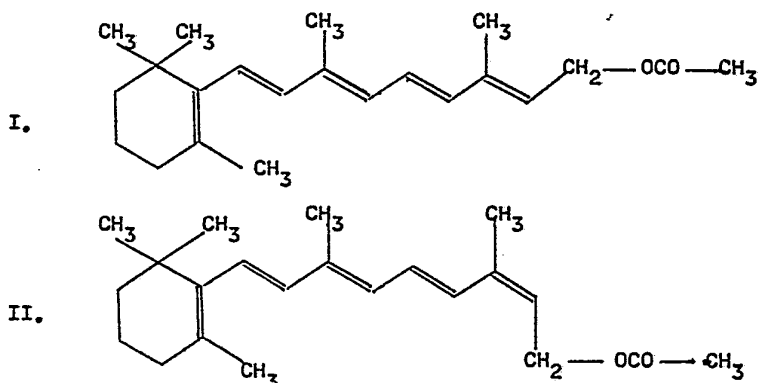
Retenčný čas externého štandardu : cca 4 min.

Príklad 2

Stanovenie responzného faktora ako v príklade 1. Príprava vzorky: Do 100 ml odmernej banky sa naváži asi 0,030 g vzorky vo forme koncentrátu octanu vitamínu A, pridá sa izopropanol a vzorka sa rozpustí pretrepaním. Banka sa doplní po značku izopropanolom. Roztok sa prefiltruje cez filtračný papier a z filtrátu sa pipetuje 2 ml do 25 ml odmernej banky a doplní sa po značku izopropanolom. Z tohoto roztoku sa nastrekuje 2x do kvapalinového chromatografu a ďalej sa postupuje ako v príklade 1.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Použitie 2,6-ditercbutyl-4-metylfenolu ako sekundárneho externého štandardu pre stanovenie obsahu octanu vitamínu A vzorcov I. a II.



metódou kvapalinovej chromatografie na silikageli s chemicky viazanými okta-decylovými skupinami.