МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Спектрофотометрическое определение фосфора** |  | **ОФС.1.2.3.0020** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.3.0020.15** |

|  |
| --- |
|  |

Методы спектрофотометрического определения фосфора основаны на использовании окислительного разложения, в результате которого фосфор переводится в фосфат-ионы, образующие с молибденовой кислотой окрашенные соединения.

Выбор метода спектрофотометрического определения фосфора и способа минерализации связан с составом, свойствами лекарственного средства и количеством содержащегося в нём фосфора.

Минерализацию осуществляют методами:

1) сжигания в атмосфере кислорода (метод 1);

2) сжигания с окислительными смесями концентрированных кислот (метод 2);

3) сухой минерализацией – сплавлением с твёрдыми окислителями (метод 3).

В ряде случаев (при определении фосфора в фосфолипидах, нуклеиновых кислотах и других соединениях) до минерализации проводят выделение испытуемого вещества.

Определение фосфора нуклеиновых кислот по Спирину проводят спектрофотометрическим методом с определением оптической плотности при двух значениях длин волн – 270 нм и 290 нм в ультрафиолетовой области спектра.

Способы минерализации

Метод 1

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Метод сжигания в колбе с кислородом».

Метод 2

*Методика 1.* Используется для лекарственных средств из животного и растительного сырья.В колбу Кьельдаля помещают точную навеску (или отмеренный объём) лекарственного средства, указанную в фармакопейной статье, содержащую 0,2–0,3 мг фосфора, прибавляют 3 мл серной кислоты концентрированной и 3 мл азотной кислоты концентрированной или 3 мл хлорной кислоты, перемешивают. Колбу закрывают стеклянной воронкой и осторожно нагревают, начиная с 50 °С, постепенно повышая температуру до 250±50 °С. Прибавляют по каплям 1 мл азотной кислоты концентрированной; повторяют добавление кислоты по 1 мл каждые 5 мин до получения раствора слабо-жёлтого цвета и прекращают нагревание. К охлаждённому раствору осторожно, небольшими порциями, прибавляют 20 мл воды и кипятят 30 мин. Одновременно в аналогичных условиях минерализуют контрольную пробу.

*Методика 2.* Используется преимущественно для витаминных лекарственных средств с минералами. В колбу Кьельдаля или высокую термостойкую пробирку помещают точную навеску лекарственного средства, эквивалентную содержанию фосфора 100 мг или указанному в фармакопейной статье, прибавляют 25 мл азотной кислоты концентрированной, осторожно нагревают в течение 30 мин на газовой горелке, электрическом колбонагревателе или плитке, прибавляют 15 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и продолжают нагревание до исчезновения бурых паров.

Метод 3

Метод используется для витаминных лекарственных средств с минералами.

Помещают точную навеску предварительно подготовленного, как описано в фармакопейной статье, лекарственного средства в платиновый или кварцевый тигель (при необходимости в образцах с маслом тигель выдерживают в сушильном шкафу при 110 °C в течение 10 мин или более для полной абсорбции масла магния оксидом), осторожно сжигают на открытом пламени газовой горелки или электроплитке в присутствии магния оксида (от 3,0 мг до 2,5 г; количество магния оксида должно быть указано в фармакопейной статье) до обугливания, и продолжают сжигание в муфельной печи при температуре 900±100 °С до тех пор, пока весь остаток не станет белого цвета (3±2 ч).

Спектрофотометрические методики определения фосфора

Образующиеся после минерализации фосфат-ионы взаимодействуют с молибденовой кислотой с образованием жёлтых гетерополикомплексов – фосфорномолибденовых кислот, переходящих под действием восстановителей (аскорбиновой кислоты, гидразина сульфата, эйконогена, метола или других) в фосфорномолибденовую синь, интенсивность окраски которой пропорциональна содержанию фосфора. Состав фосфорномолибденовой сини зависит от природы восстановителя, кислотности раствора, температуры и других условий. От природы восстановителя зависят скорость реакции, чувствительность метода и положение максимума поглощения.

В спектре поглощения фосфорномолибденовой сини для испытуемого лекарственного средства определяют положение максимума. При необходимости перед проведением цветной реакции испытуемый раствор нейтрализуют натрия гидроксида раствором 5 М (или другой концентрации, указанной в фармакопейной статье) в присутствии 1–2 капель фенолфталеина раствора 1 %, избыток щёлочи нейтрализуют серной кислоты раствором 0,05 М (или другой концентрации, указанной в фармакопейной статье).

*Методика 1*

Используется преимущественно для витаминных лекарственных средств с минералами, с аскорбиновой кислотой.

*Ацетатный буферный раствор рН 4,0.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 10 мл уксусной кислоты раствора 1 М, 25 мл натрия ацетата раствора 0,1 М и доводят объём раствора водой до метки. Срок годности полученного раствора – 3 мес.

Методы минерализации и приготовления раствора должны быть указаны в фармакопейной статье. В одну из трёх мерных колб вместимостью 25 мл помещают 2,0 мл раствора, приготовленного после минерализации, в другую – 2,0 мл фосфора стандартного раствора 20 мкг/мл и в третью – 2,0 мл воды (контрольный раствор). В каждую из трёх колб прибавляют по 10 мл ацетатного буферного раствора рН 4,0, 2,5 мл аммония молибдата раствора 1 % в серной кислоте и 2,5 мл свежеприготовленного аскорбиновой кислоты раствора 1 % и доводят объёмы растворов ацетатным буферным раствором рН 4,0 до метки. Точно через 10 мин после добавления аскорбиновой кислоты раствора 1 % измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов в максимуме поглощения при длине волны 740 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольного раствора.

Содержание фосфора в субстанции или препарате в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | $$X=\frac{A\_{1}∙V∙20∙100}{A\_{0}∙a∙10^{6}} ,$$ | (1) |  |
| где | $$A\_{1}$$ | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |  |
|  | $$A\_{0}$$ | – | оптическая плотность стандартного раствора; |
|  | $$V$$ | – | объём воды, используемый для приготовления испытуемого раствора после минерализации, мл; |
|  | $$a$$ | – | навеска субстанции или препарата, г; |  |
|  | 20 | – | концентрация фосфора в фосфора стандартном растворе 20 мкг/мл. |

*Методика 2*

Используется преимущественно для лекарственных средств из животного и растительного сырья.

*Восстанавливающий раствор*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 4,0 г метола и 10,0 г натрия сульфита гептагидрата, растворяют в 150 мл воды, прибавляют 196 г натрия метабисульфита, растворённого в 600 мл воды, доводят объём раствора водой до метки и фильтруют. Срок годности раствора – 30 сут.

*Проба на содержание фосфора в используемых реактивах.* При смешивании 5 мл восстанавливающего раствора, 10 мл аммония молибдата раствора5 % в серной кислоте (2) и 20 мл натрия ацетата раствора насыщенного не должно появляться синего окрашивания.

Проводят минерализацию, как указано в методике 1 метода 2. Содержимое колбы количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через сухой обеззоленный бумажный фильтр, отбрасывая первые 15 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 15,0 мл фильтрата, прибавляют 35 мл воды, 5,0 мл восстанавливающего раствора, 10 мл аммония молибдата раствора5 % в серной кислоте (2) и выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Соотношение фильтрата и воды (общий объём 50 мл) может быть изменено в зависимости от содержания фосфора в фильтрате.

Параллельно в аналогичных условиях готовят стандартный и контрольный растворы, помещая в мерную колбу вместимостью 100 мл 20,0 мл фосфора стандартного раствора 20 мкг/мл, 30 мл воды (стандартный раствор) или 50 мл воды (контрольный раствор) и те же количества реактивов, как для испытуемого раствора.

Точно через 10 мин в колбы с испытуемым, стандартным и контрольным растворами прибавляют по 20 мл натрия ацетата раствора насыщенного, доводят объём раствора в каждой колбе водой до метки, тщательно перемешивают и через 22,5±2,5 мин измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов в максимуме поглощения при длине волны 725 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольного раствора.

Содержание фосфора в субстанции или препарате в процентах (Х) вычисляют по формуле:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $$X=\frac{A\_{1}∙100∙100∙20∙20∙100}{A\_{0}∙a∙15∙100∙10^{6}} ,$$ | (2) |
| где | *A*1 | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *A*0 | – | оптическая плотность стандартного раствора; |
|  | $$a$$ | – | навеска субстанции или препарата, г; |
|  | $$20$$ | – | концентрация фосфора в фосфора стандартном растворе 20 мкг/мл. |

*Методика 3*

Используется преимущественно для витаминных лекарственных средств с минералами, с гидрохиноно.

Способ минерализации, навеска лекарственного средства или содержание фосфора в пробе должны быть указаны в фармакопейной статье. В мерную колбу вместимостью 500 мл с помощью воды количественно переносят полученный остаток после минерализации, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мл полученного раствора, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. В одну из трёх мерных колб вместимостью 25 мл помещают 5,0 мл испытуемого раствора, в другую – 5,0 мл фосфора стандартного раствора 20 мкг/мл и в третью – 5,0 мл воды (контрольный раствор). В каждую из трёх колб прибавляют по 1,0 мл аммония молибдата раствора5 % в серной кислоте (3), 1,0 мл гидрохинона раствора 0,5 % и 1,0 мл натрия гидросульфита раствора 20 %, перемешивают и доводят объёмы растворов в каждой колбе водой до метки, перемешивают и выдерживают в течение 30 мин, измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов в максимуме поглощения при длине волны 650 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольного раствора.

Содержание фосфора в субстанции или препарате в процентах (Х) вычисляют по формуле:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $$X= \frac{A\_{1} ∙500 ∙100 ∙25 ∙5∙20 ∙100}{A\_{0} ∙a ∙10 ∙5 ∙25∙10^{6}} ,$$ | (3) |
| где | *A*1 | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |  |
|  | *A*0 | – | оптическая плотность стандартного раствора; |  |
|  | $$a$$ | – | навеска субстанции или препарата, г, |  |
|  | $$20$$ | ­ | концентрация фосфора в фосфора стандартном растворе 20 мкг/мл. |

*Методика 4*

Используется для определения примесей или количественного определения фосфора, с эйконогеном.

*Раствор эйконогена*. Готовят одним из двух способов.

A. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,750 г натрия сульфита, 14,150 г натрия гидросульфита и 0,105 г эйконогена, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. Полученный раствор используют свежеприготовленным.

Б. Готовят сухую смесь из 5,0 г натрия сульфита, 94,3 г натрия гидросульфита и 0,70 г эйконогена при тщательном перемешивании. В день определения в мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,5 г сухой смеси, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

Полученный остаток после минерализации (методику выбирают в зависимости от природы вещества) растворяют в 10 мл воды и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, перемешивают, прибавляют 0,75 мл аммония молибдата раствора 8,3 % в серной кислоте, 1,0 мл раствора эйконогена и доводят объём раствора водой до метки.

Готовят стандартный раствор, помещая 1–3 мл фосфора стандартного раствора 5 мкг/мл в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляя те же реактивы, что и в испытуемый раствор.

Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов в максимуме поглощения при длине волны 620 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольного раствора.

Содержание фосфора в субстанции или препарате в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | $$X= \frac{A\_{1} ∙V\_{0} ∙25∙5∙100}{A\_{0} ∙a ∙25 ∙10^{6}} ,$$ | (4) |
| где | $$A\_{1}$$ | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |  |
|  | $$A\_{0}$$ | – | оптическая плотность стандартного раствора; |  |
|  | $$a$$ | – | навеска субстанции или препарата, г; |  |
|  | $$V\_{0}$$ | – | объём фосфора стандартного раствора, мл; |  |
|  | $$5$$ | – | концентрация фосфора в фосфора стандартном растворе 5 мкг/мл. |

Для нормирования предельного содержания примесей возможно сравнение значений оптической плотности испытуемого и стандартного растворов. Оптическая плотность испытуемого раствора не должна превышать оптическую плотность стандартного раствора.

*Методика 5*

Используется преимущественно для витаминных лекарственных средств с минералами, с гидразина сульфатом.

*Молибденовый реактив.* Растворяют 6,86 г натрия молибдата в 200 мл воды (раствор А); растворяют 0,40 г гидразина сульфата в 100 мл воды (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 1000 мл, содержащую 500 мл воды, осторожно прибавляют при охлаждении и перемешивании 100 мл серной кислоты концентрированной, туда же полностью переносят растворы А и Б и доводят объём раствора водой до метки. Реактив используют свежеприготовленным.

Остаток после минерализации (способ минерализации указывают в фармакопейной статье), содержащий от 0,25 до 1,50 мг фосфора, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл с помощью 45±5 мл воды, прибавляют 20 мл серной кислоты раствора 1 М и перемешивают. Если остаток не растворился, прибавляют ещё небольшое количество серной кислоты раствора 1 М и доводят объём раствора водой до метки.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,0 мл полученного раствора, прибавляют 20 мл молибденового реактива, 50 мл воды и выдерживают на кипящей водяной бане, в течение 30 мин. Охлаждают до комнатной температуры, доводят объём раствора водой до метки и измеряют оптическую плотность полученного раствора в максимуме поглощения при длине волны 830 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольного раствора и определяют концентрацию фосфора в испытуемом растворе по калибровочному графику.

*Построение калибровочного графика.* В мерные колбы вместимостью 100 мл помещают 2,0; 5,0; 7,5; 10,0 и 15,0 мл фосфора стандартного раствора 10 мкг/мл, прибавляют по 20 мл молибденового реактива и далее поступают, как указано выше для испытуемого раствора.

Строят калибровочный график, откладывая по оси ординат оптическую плотность, а по оси абсцисс – концентрацию фосфора в мкг/мл.

Содержание фосфора в субстанции или препарате в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | $$X= \frac{С ∙500 ∙100 ∙100}{a ∙5 ∙10^{6}} ,$$ | (5) |
| где | $$С$$ | – | концентрация фосфора, определенная по калибровочному графику, мкг/мл; |
|  | $$a$$ | – | навеска субстанции или препарата, г. |  |

Определение фосфора нуклеиновых кислот по Спирину

Метод основан на измерении разности показателей поглощения в ультрафиолетовой области при двух значениях длин волн после обработки испытуемого лекарственного средства раствором хлорной кислоты при нагревании. В фармакопейных статьях в зависимости от соотношения содержания нуклеиновых кислот (дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой, а также их фрагментов) допускаются модификации методик гидролиза.

*Методика*

К 1,0 мл раствора образца, содержащего 15–35 мкг нуклеиновых кислот, помещенного в термостойкую центрифужную пробирку или колбу, прибавляют 5,0 мл хлорной кислоты раствора 0,5 М (другие условия указывают в фармакопейной статье) и закрывают стеклянным колпачком или присоединяют воздушный холодильник. Смесь выдерживают на кипящей водяной бане в течение 20 мин, охлаждают и при необходимости (при наличии осадка) центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин, измеряют оптическую плотность гидролизованного прозрачного раствора или надосадочной жидкости при длинах волн 270 нм и 290 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. При высоких значениях оптической плотности растворы разводят хлорной кислоты раствором 0,5 М (разведение должно быть указано в фармакопейной статье). В качестве контрольного раствора используют хлорной кислоты раствор 0,5 М.

Метод применим при выполнении условия: *А*270 и *А*290 не должны отличаться более чем на 15 %.

Содержание фосфора в субстанции или препарате в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $$X=\frac{(A\_{270}-A\_{290})∙V∙F∙6∙100}{a∙l∙1∙0,19∙10^{6}}$$ | (6) |
| где | $$A\_{270}$$ | – | оптическая плотность испытуемого раствора при 270 нм; |  |
|  | $$A\_{290}$$ | – | оптическая плотность испытуемого раствора при 290 нм; |  |
|  | $$a$$ | – | навеска субстанции или препарата, г; |  |
|  | $$V$$ | – | объём, в котором растворена субстанция или препарат, мл; |
|  | *F* | – | степень дополнительного разведения испытуемого раствора;  |
|  | $$l$$ | – | толщина оптического слоя, см; |  |
|  | $$0,19$$ | – | разность удельных показателей поглощения нуклеиновых кислот (Δ*А*1см) при длинах волн 270 и 290 нм при содержании фосфора 1 мкг/мл, мл/(мкг·см). |