

مقدمه

تعیین مقدار ویتامین A بعنوان ماده اولیه در برخی از پمادهای دارویی مانند ویتامین A چشمی و A+D در صنعت دارو از اهمیت ویژه ای برخوردار است .
با توجه به اینکه در کتابهای مرجع BP,USP و فارماکوپه اروپا روشی برای تعیین مقدار آن ذکر نشده است ، در کارخانجات دارویی به روشهای مختلف تعیین مقدار می شود .
یکی از روشهای رایج استفاده از دستگاه HPLC است.

روش تهیه محلول استاندارد

محلول استاندارد (Standard) : (85 Iu/10ml)

مقداری از ویتامین A استاندارد را باید توزین و به حجم برسانید که در نهایت دارای غلظت 85Iu/10ml باشد .
طبق برگ آنالیز استاندارد، اگر مقدار ویتامین A در هر گرم 1 MIU باشد 85mg و اگر 1.7 MIU باشد 50mg و اگر 1.77 MIU باشد 48mg و اگر 1.78 MIU باشد 47.753 mg را توزین کنید .
با توجه به واحد ویتامین A استاندارد ، مقدار لازم را توزین کنید و با هگزان - ایزوپروپیل الکل (50:50) در یک بالن ژوژه به حجم 10 ml برسانید و سه بار به نسبت 1/10 با ایزوپروپیل الکل رقت داده تا به غلظت 85 Iu/10ml برسد .

روش تهیه محلول تست

آن مقدار از نمونه تست را باید توزین و به حجم برسانید که در نهایت دارای غلظت 85Iu/10ml باشد .

ماده اولیه ویتامین A: (85Iu/10ml)

مقدار ویتامین A اگر در برگ آنالیز سازنده بعنوان مثال 1,7 min/gr باشد :
50mg از آن را بدقت وزن کنید و در یک بالن ژوژه با هگزان - ایزوپروپیل الکل به حجم 10ml برسانید و سه بار به نسبت 1/10 با ایزوپروپیل الکل رقت داده تا به غلظت 85Iu/10ml برسد .

ماده اولیه روغن ماهی (Cod liver oil) : (85Iu/10ml)

با توجه به برگه آنالیزهای سازنده های مختلف ، فرض کنید میانگین هر 1 gr روغن ماهی بطور

متوسط 1000 Iu ویتامین A دارد پس 850mg آن 850 Iu ویتامین دارد :
850 mg روغن ماهی را بدقت وزن کنید و در یک بالن ژوژه با هگزان - ایزوپروپیل الکل حل کنید و به حجم 10 ml برسانید و 2 دقیقه سونیکیت کنید . 1 ml از آن را بردارید و با ایزوپروپیل الکل به حجم 10 ml برسانید .

پماد (A+D): (85Iu/10ml)

هر 100 g پماد A+D حاوی 85000 Iu ویتامین A است پس :
در یک بشر کوچک 1 g از پماد را بدقت وزن کنید و 5 ml هگزان - ایزوپروپیل الکل (50:50) به آن اضافه کنید و روی استیرر بگذارید تا حل شود سپس در یک بالن ژوژه به حجم 10 ml برسانید و به مدت 5 دقیقه سونیکیت کنید . پس از اینکه پایه پماد ته نشین شد ، از محلول روئی به نسبت 1/10 با ایزوپروپیل الکل رقت داده شود . پس از فیلتر کردن تزریق کنید .

پماد سوختگی : (85Iu/10ml)

50% از پماد سوختگی را روغن ماهی تشکیل می دهد. با توجه به برگه آنالیز اگر هر یک گرم روغن ماهی 1000 Iu ویتامین A داشته باشد پس 50 g آن 50000 Iu ویتامین A دارد . در واقع می توان گفت هر 100 g پماد سوختگی حاوی 50000 ویتامین A است. در نتیجه 3.44 g آن حاوی 1720 Iu ویتامین A است پس :

در یک بشر کوچک 3.44 g از پماد را بدقت وزن کنید و در حدود 10 ml هگزان - ایزوپروپیل الکل (50:50) به آن اضافه کنید و روی استیرر بگذارید تا حل شود (15 دقیقه) سپس در یک بالن ژوژه به حجم 20 ml برسانید و به مدت 5 دقیقه سونیکیت کنید پس از اینکه پایه پماد ته نشین شد 1ml از محلول روئی بردارید و با ایزوپروپیل الکل به حجم 10ml برسانید.

پماد چشمی : (85Iu/10ml)

هر 1 g پماد چشمی 250 Iu ویتامین A دارد در نتیجه 680mg آن 170 Iu دارد پس :
در یک بشر کوچک 680mg از پماد را بدقت وزن کنید و در حدود 5 ml هگزان - ایزوپروپیل الکل (50:50) به آن اضافه کنید و روی استیرر بگذارید تا حل شود (15 دقیقه) سپس به حجم 10 ml برسانید و به مدت 5 دقیقه سونیکیت کنید . پس از اینکه پایه پماد ته نشین شد ، 5ml از محلول روئی ر و با ایزوپروپیل الکل به حجم 10ml برسانید . پس از فیلتر کردن تزریق کنید .

شرایط سیستم کروماتوگرافی

Mph : Methanol HPLC Grade
Flow rate : 1 ml/min
Wavelength : 320 nm
Column : Nucleosil 100-5C8-25cm×4.6mm id
Inj . vol. : 20 µl

روش محاسبه

ماده اولیه ویتامین A

رنج قابل قبول : <992-1212> : واحد ویتامین A (با توجه به برگ آنالیز سازنده) $(ru/rs) \times$

ماده اولیه روغن ماهی

رنج قابل قبول : <900-1100> : واحد ویتامین A در روغن ماهی (برحسب 1000 Iu/g) $(ru/rs) \times$

پماد A+D

رنج قابل قبول : <765-935> : واحد ویتامین A در پماد ویتامین A+D (برحسب 850 Iu/g) $(ru/rs) \times$

پماد سوختگی

رنج قابل قبول : <522-639> : واحد ویتامین A در پماد سوختگی (برحسب 580 Iu/g) $(ru/rs) \times$

پماد چشمی

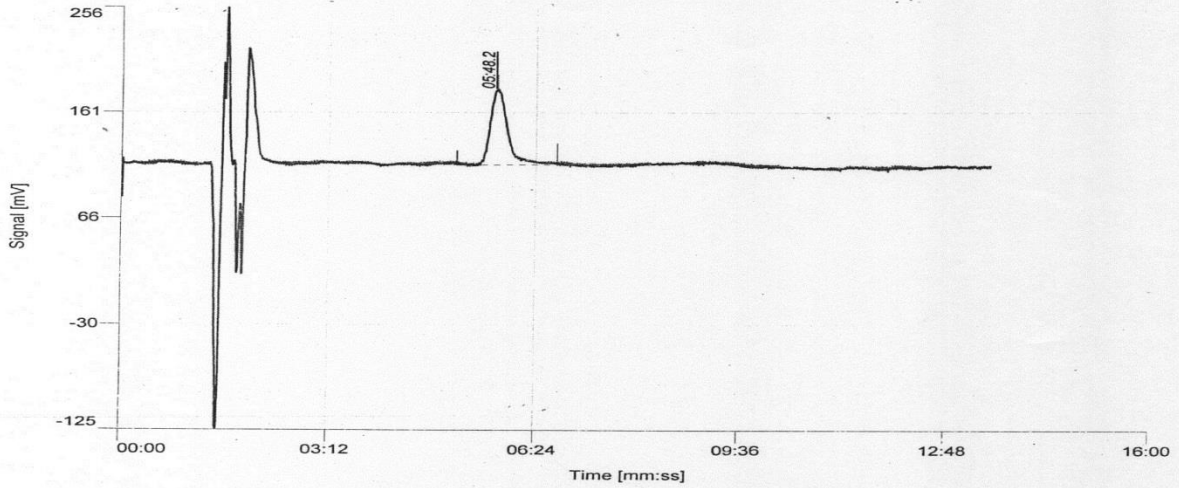
رنج قابل قبول : <225-275> : واحد ویتامین A در پماد چشمی (برحسب 250 Iu/g) $(ru/rs) \times$

مقایسه کروماتوگرام ها

کروماتوگرام های تست و استاندارد ویتامین A در ماده اولیه ، روغن ماهی ، پماد چشمی ، پماد A+D و پماد سوختگی با فاز متحرک متانل و در طول موج 320nm در کروماتوگرامهای زیر ارائه شده است :

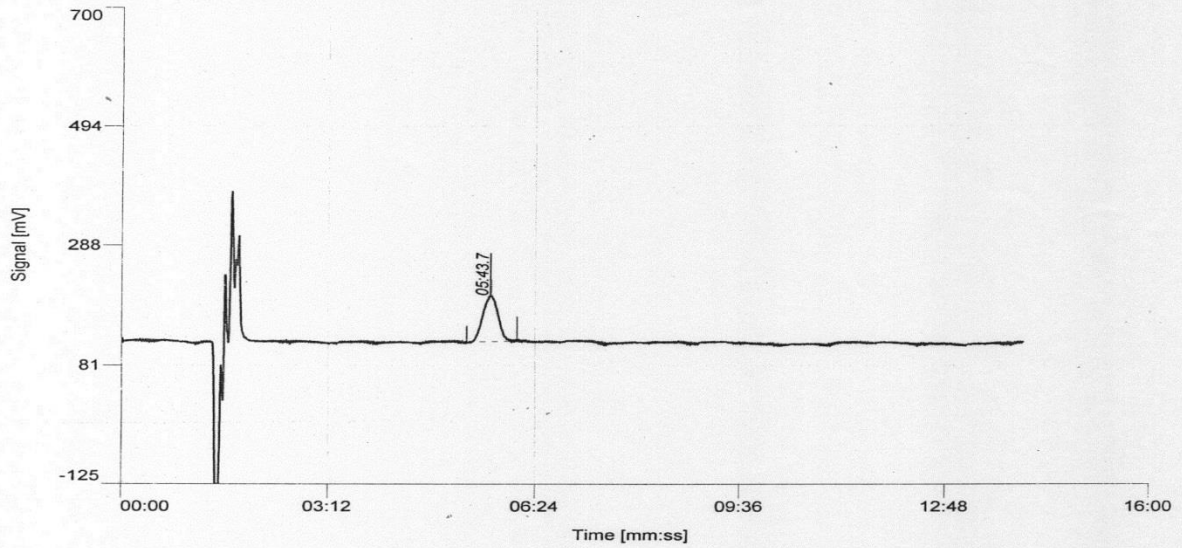
کروماتوگرام تست و استاندارد ویتامین A در ماده اولیه

Assay Vitamin A -Raw material - Test
 Batch no:
 Sensevity: 7+0.5
 Manual Baseline



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mVs]	Height [mV]	Quantity
001	***	05:48.2	05:10.4	06:43.8	1275.1	68.9	N/A

Assay Vitamin A - STD
 Batch no:
 Sensevity: 7+0.5
 Manual Baseline

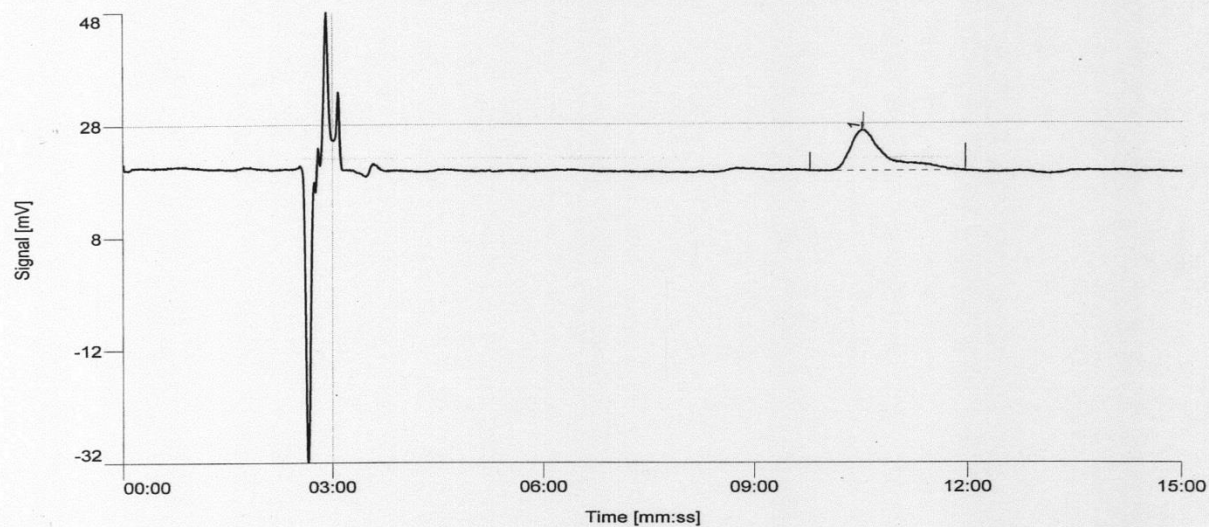


No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mVs]	Height [mV]	Quantity
001	***	05:43.7	05:20.6	06:07.4	1275.6	78.0	N/A

کروماتوگرام تست و استاندارد ویتامین A در روغن ماهی

Vitamin A: Cod Liver Oil - Test
 Batch No:
 Sensitivity: 7+0.5
 Operator:

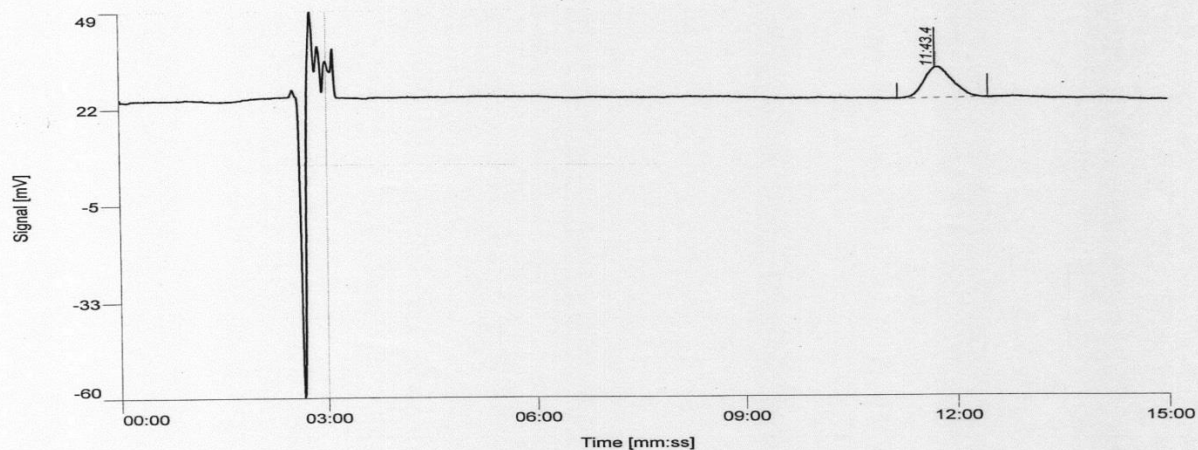
Manual Baseline



No.	Ret. Time [mm:ss]	Area [mVs]	Height [mV]	Area %	Height %	Plate Eff. 50%	Plate Eff. 10%	Asymmetry
001	10:31.7	245.3	7.2	100.000	100.000	3248.10	1086.05	0.33

Vitamin A: STD
 Reference No: Vit-A-12-15
 Sensitivity: 7+0.5

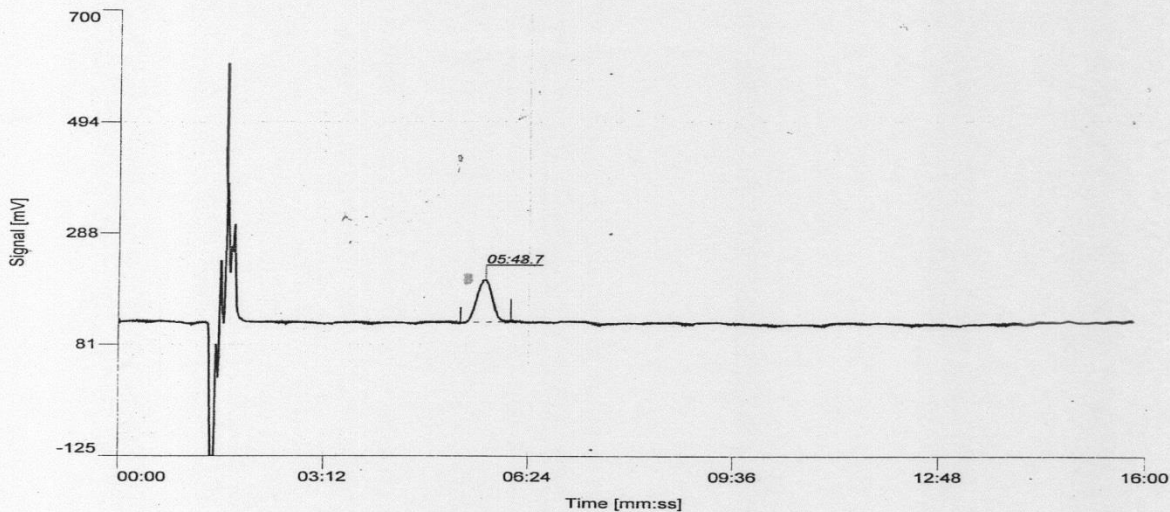
Manual Baseline



No.	Ret. Time [mm:ss]	Area [mVs]	Height [mV]	Area %	Height %	Plate Eff. 50%	Plate Eff. 10%	Asymmetry
001	11:43.4	242.4	8.6	100.000	100.000	3962.54	3832.55	0.97

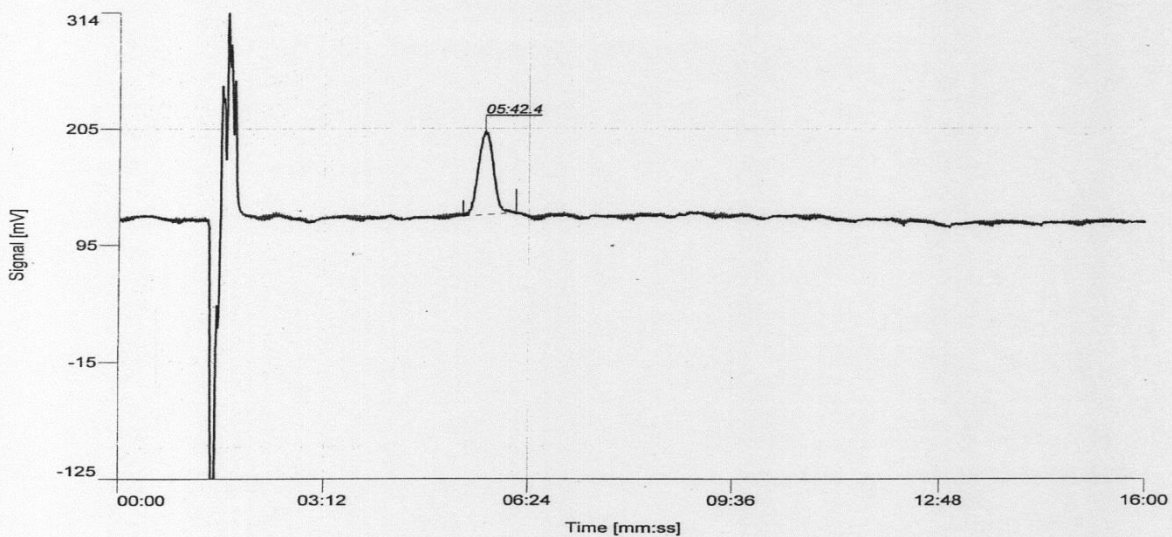
کروماتوگرام تست و استاندارد ویتامین A در پماد چشمی

Assay Vitamin A - Ophthalmic ointment A - Test
 Batch no:
 Sensivity: 7+0.5
 Manual Baseline



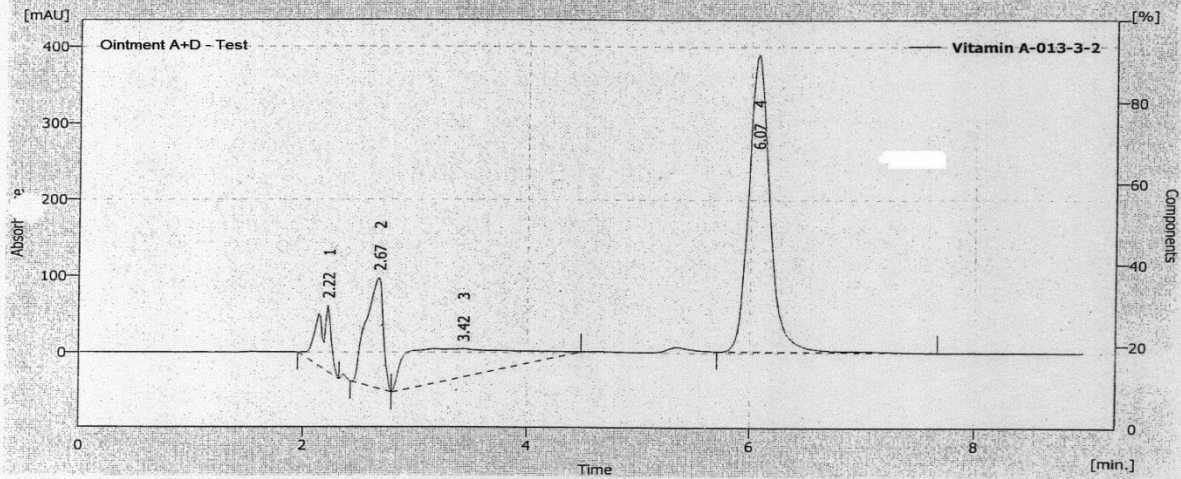
No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mVs]	Height [mV]	Quantity
001	*	05:43.7	05:20.6	06:07.4	1275.0	78.0	N/A

Assay Vitamin A - Ophthalmic ointment A - STD
 Batch no:
 Sensivity: 7+0.5
 Manual Baseline



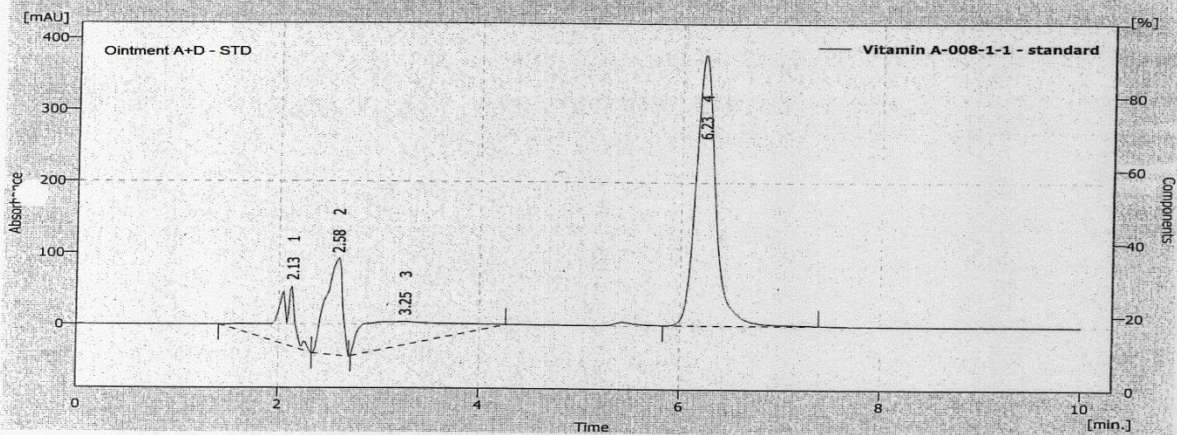
No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mVs]	Height [mV]	Quantity
001	*	05:42.4	05:21.9	06:11.8	1284.7	79.4	N/A

کروماتوگرام تست و استاندارد ویتامین A در پماد A+D



Result Table (Uncal - Vitamin A-013-3-2)

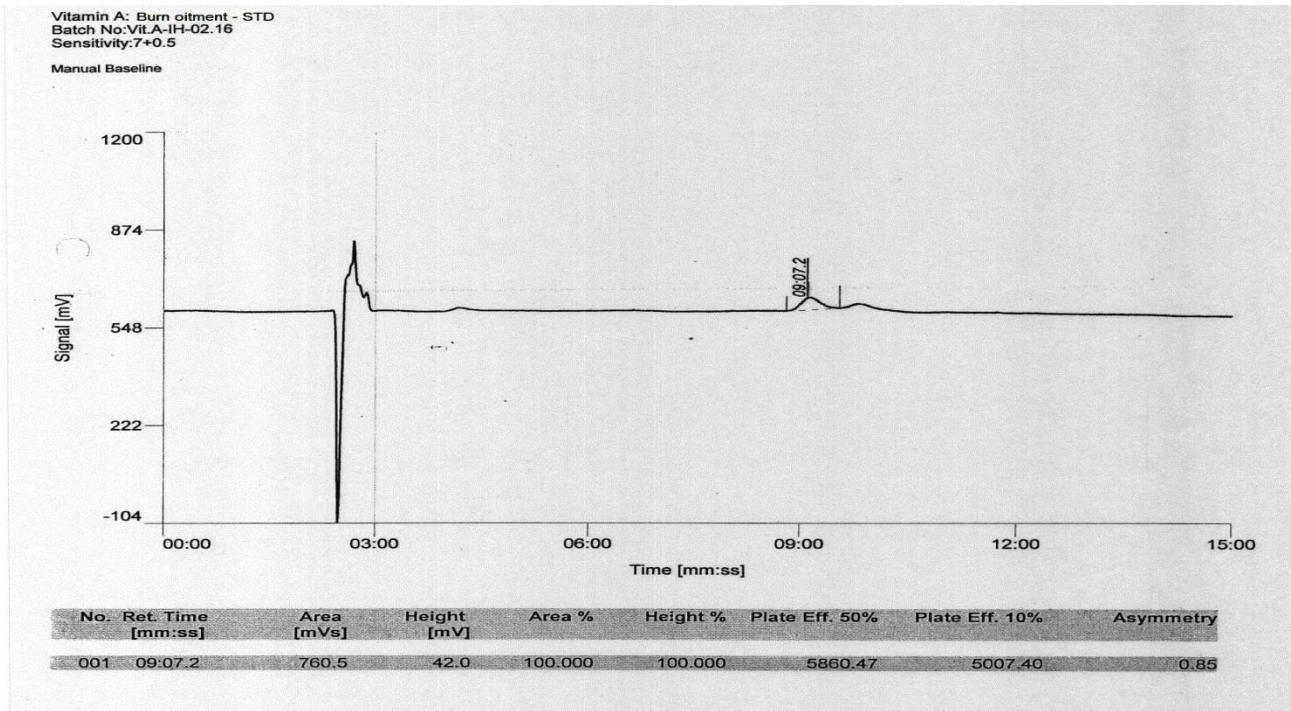
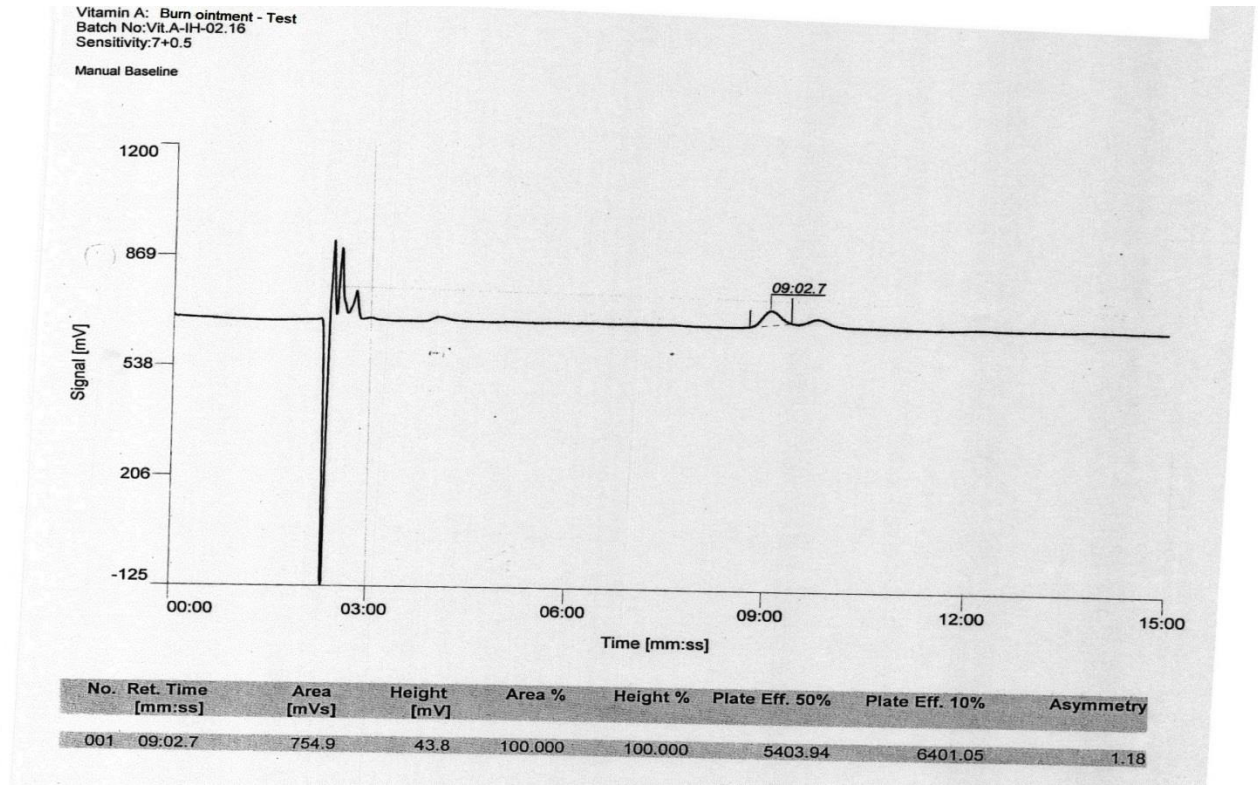
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2.217	69.703	8.663	7.0	13.2	0.07
2	2.667	152.771	14.495	15.2	22.1	0.22
3	3.417	263.989	3.712	26.3	5.7	1.63
4	6.067	515.878	38.826	51.5	59.1	0.20
	Total	1002.342	65.695	100.0	100.0	



Result Table (Uncal - Vitamin A-008-1-1 - standard)

	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2.133	120.324	8.403	12.2	13.4	0.08
2	2.583	153.482	13.418	15.5	21.3	0.23
3	3.250	202.813	3.233	20.5	5.1	1.50
4	6.233	513.615	37.812	51.9	60.1	0.20
	Total	990.234	62.866	100.0	100.0	

کروماتوگرام تست و استاندارد ویتامین A در پماد سوختگی



نتیجه

تعیین مقدار ویتامین A در ماده اولیه و محصولات ذکر شده توسط HPLC به روش بالا دارای مزایای زیر می باشد:

- پمپ ها و ستون با فاز متحرک متانل به سرعت stable می شوند و می توان آنالیز را سریعا شروع کرد.
- خط زمینه در این روش noise بسیار کمتری دارد.
- تفاوت Run time بین پیک حلال با پیک ویتامین A زیاد است در نتیجه تداخل کمتری دارند.
- نتایج نسبت به روشهای دیگر تکرار پذیر و قابل اطمینان هستند.

