



DETERMINATIONS CHROMATOGRAPHIQUES, SPECTROPHOTOMETRIQUES ET TITRIMETRIQUES DE VITAMINE C DANS PHARMACEUTIQUES♦

Ana-Maria Hossu^{1*}, Mihaela Scripcariu², Cristiana Radulescu¹,
Elena Irina Moater¹, Ionica Ionita¹

¹*Université „Valahia” Targoviste, Faculté des Sciences, Département de
Chimie, Rue Unirii 18-20, Targoviste, Roumanie*

²*Institut de Control pour des Produits Biologiques et Pharmaceutiques
d'Usage Vétérinaire, Rue Dudului 37, Secteur 6, Bucarest, Roumanie*

*Correspondance: anahossu@yahoo.co.uk

Abstract: The determination of vitamin C has gained increased significance in several areas of analytical chemistry such as pharmaceutical, clinical and food application.

In this paper, three rapid and accurate methods of determining ascorbic acid are presented. The proposed methods were successfully applied to pharmaceutical preparations.

Potassium iodide has been used as the titrant for the determination of acid ascorbic, according to pharmacopoeias. The present paper reports on a direct spectrophotometric method of determining ascorbic acid with chloric acid 0.1 N by measuring the absorbance of the reaction at 245 nm. HPLC analyses of ascorbic acid on column Lichrosorb NH₂ with acetonitril-KH₂PO₄ as the mobile phase were compared with the titrimetric and spectrophotometric methods.

Keywords: *vitamin C, ascorbic acid, titrimetry, spectrophotometry, chromatography, HPLC*

♦ Paper presented at **COFrRoCA 2006: Quatrième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée**, 28 June – 2 July, Clermont-Ferrand, France

INTRODUCTION

L'acide ascorbique est une vitamine importante qui participe à une grande variété d'événements biologiques concernant les réactions de transport d'électrons, hydroxylation, le catabolisme oxydative d'aminoacides aromatiques, etc. Des nombreux papiers et des révisions ont décrit la détermination d'acide ascorbique. Les méthodes utilisées incluent titrimétrie, spectrophotométrie, fluorimétrie, électrochimie, chromatographie, procédures cinétiques, chemiluminescence.

Le présent papier fait une étude comparative entre trois méthodes rapides et exactes pour déterminer l'acide ascorbique existant dans les préparations pharmaceutiques.

MATERIAUX ET METHODES D'ANALYSE

Les fioles de solution orale de Complexe Aquavita (Syva - Espagne) utilisé dans ce papier contiennent une mixture de vitamines liposolubles comme A, D₃, E, K₃ et des vitamines hydrosolubles : B₁, B₂, B₆, B₁₂, C.

Les limites pour la contenant de vitamine C dans ce produit pharmaceutique sont 45-55 mg/mL.

Pour la détermination d'acide ascorbique, trois méthodes sont utilisées : la méthode titrimétrique avec iodure de potassium présentée dans les pharmacopées [1, 2]; la méthode spectrophotométrique avec acide chlorique 0,1 N en mesurant l'absorbance de la réaction à 245 nm, et la méthode chromatographique comme technique de séparation pour les composantes de mixture, couplé avec détection UV pour l'analyse quantitative.

Les epreuves ont été réalisées avec une chromatographe de liquides Spectra-Physique modèle Analytique P 4000 avec un détecteur UV modèle 2000 (Spectra-Physics Analytical). Ce système a été raccordé à un ordinateur Pentium III à 800 MHz.

Le détecteur UV 2000 était des endroits à une longueur d'onde $\lambda = 268$ nm pour la détermination de vitamine C ; la phase mobile a été composé de tampon phosphate 14 % et d'acétonitrile 86 % qui a permis une très bonne séparation de vitamine C sur la colonne Lichrosorb NH₂.

Ils sont prépare 6 échantillons du ce produit pharmaceutique pour chaque méthode d'analyse et c'est présentée la valeur moyenne.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Méthode titrimétrique

Il a été annoncé beaucoup des méthodes titrimétriques utilisant différent titrants.

La détermination d'acide ascorbique avec l'iode, le iodure de potassium et le bromure de potassium [1, 2] et l'amidon comme l'indicateur a été annoncé par beaucoup des chercheurs, mais il a été remarqué que l'amidon ne peut pas être utilisé dans de telles titrage parce qu'il diminue le taux de réaction entre l'acide ascorbique et l'iode. Autres agents comme variamine bleu, tétrachlorure de carbone ou le chloroforme en présence du chlorure mercurique et de *p*-ethoxychrysoidine comme les indicateurs ont été recommandés. Leur utilisation dans l'essai d'acide ascorbique a été reconsidérée par Murty et Rao [3] qui proposent le bleu naphthol, l'amarante noir ou Ponceau Brillant 5R comme des indicateurs alternatifs.

Une méthode oxydimétrique récente [4] implique l'utilisation de chloramine-T pour les mixtures d'acide ascorbique avec thiols. Cette méthode exige le fait de masquer de thiol par cyanoethylation cela avec l'acrylonitrile. Les auteurs réclament que les produits cyanoethylatique de thiols n'entravent pas la réaction et que l'acide ascorbique pourrait être titré avec l'utilisation de chloramine-T, 2,6-dichlorophenolindophenol comme l'indicateur. Ce pas titrimétrique finissant est fondé sur la méthode [5] de déterminer plusieurs agents oxydant en incluant chloramine-T en titrage de l'acide ascorbique utilisant 2,6-dichlorophenolindophenol comme l'indicateur.

2,6-Dichlorophenolindophenol (DCIP) a été utilisé comme le titrant pour la détermination d'acide ascorbique [6]. La méthode est fondée sur la réduction de DCIP avec l'acide ascorbique dans la solution acide. C'est une méthode officielle [7], ce n'est pas applicable à beaucoup de préparations pharmaceutiques contenant Fe(II), Sn(II), Cu(I), SO₂ et les ions S₂O₃²⁻ qui sont d'habitude associés aux préparations minérales. La validité d'application de la méthode est restreinte à seulement ces tablettes de multi vitamines qui ne contiennent pas de minéraux. De plus, DCIP a été trouvé pour oxyder thiols [8, 9] et le mécanisme de cette réaction a aussi été exploré en détail [10, 11].

Bien que cela inconvenant existe, dans ce papier la méthode avec le iodure de potassium a été utilisée comme le titrant pour la détermination d'acide ascorbique : 0,15 g d'acide ascorbique sont dissous dans 10 mL d'eau, alors 1 mL d'acide chlorique 100 g/L est ajouté, 2 mL de solution d'amidon et après que c'est titré avec le iodure de potassium 0,0167 mol/L à la couleur bleu persistante. Ainsi, aux 1 mL iodure de potassium 0,0167 mol/L correspond 0,008806 g acide ascorbique. Après l'analyse, la valeur obtenu pour 6 échantillons été 50,25 mg/mL.

Méthode spectrophotométrique

Beaucoup des méthodes spectrophotométriques sont fondées sur les propriétés de réduction, d'oxydation, ou capacité de s'accoupler avec les dérivés diazotes d'aniline. Ils sont fondés sur la réduction de fer(III) au fer(II) avec l'acide ascorbique, suivi par complexion de fer réduit (II) avec de différents agents, comme 1,10-phenanthroline et 2,2'-dipyridyl. D'autre part, l'acide ascorbique a plusieurs atomes de donateur capables de formation complexe en métal et attachant avec le zinc(II), le manganèse(II), le cadmium(II), les métaux alcalin-terreuses, etc.

L'acide ascorbique a des spectres d'absorption UV caractéristiques et ses maximums sont selon pH : $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 695$ dans HCl 0,01N ($\lambda = 245$ nm) et $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 945$ dans le tampon phosphate, pH = 6,4 ($\lambda = 265$ nm) [12].

Les méthodes spectrophotométriques dans le domaine visible sont recommandées pour le dosage d'acide ascorbique des produits de multi vitamine à cause de leur spécificité de certains d'entre eux. Szepesy [13] recommande le dosage à 240-245 nm dans le médium neutre en présence du cyanure de potassium (10 $\mu\text{g/mL}$).

Les normes de vitamines C et de solutions des échantillons ont été préparées dans l'acide chlorique 0,1 N en mesurant l'absorbance de la réaction à 245 nm. L' I_0 du spectre a été obtenu en utilisant de l'acide chlorique comme un solvant tant dans la référence que dans les cellules des échantillons. L'absorption de lumière dans une solution de l'échantillon est exprimée par le calcul de Beer :

$$\log(I_0/I) = A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Après l'analyse, la valeur obtenu pour 6 échantillons été 52,81 mg/mL (la valeur moyenne pour échantillons $A_{\text{échantillon}} = 0,732$, $A_{\text{étalon}} = 0,693$). Le calcul s'effectue comme ça :

$$\text{Concentration en vitamine C} = \frac{0,732 \cdot 50}{0,693} = 52,81 \text{ mg/mL}$$

Méthode chromatographique

La chromatographie liquide (CL) était communément utilisée pour la séparation et la détermination d'acide ascorbique, s'ensuivant ainsi dans un grand nombre de telles méthodes. Plusieurs procédures CL en utilisant des colonnes extrêmement polaires et des phases mobiles se composant des dimensions différentes d'acétonitrile et de méthanol en présence de l'acide citrique – phosphate – acide acétique diluent tampons ou une solution aqueuse d'acide citrique est annoncée pour l'essai d'acide ascorbique.

Les formes oxydées et réduites d'acide ascorbique ont été déterminées dans de différents échantillons par CL, en utilisant de l'eau - d'acétonitrile (pH 4,2, le tampon phosphate 10 mM) (4:1) ou l'acétonitrile - le potassium dihydrogenophosphate diluent (3:1/1:1) comme les phases mobiles [14-16] et en contrôlant l'absorbance UV à 210 ou 254 nm [17].

Les déterminations qui a permis une très bonne séparation de vitamine C été effectuée à une longueur d'onde $\lambda = 268$ nm et la phase mobile a été composée de tampon phosphate 14 % et d'acétonitrile 86% sur la colonne Lichrosorb NH_2 .

Le temps de rétention t_R été approximatif 7 min, qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui détermine quand le pic qui lui correspond sur le chromatogramme passe par un maximum. Les chromatogrammes sont présentés.

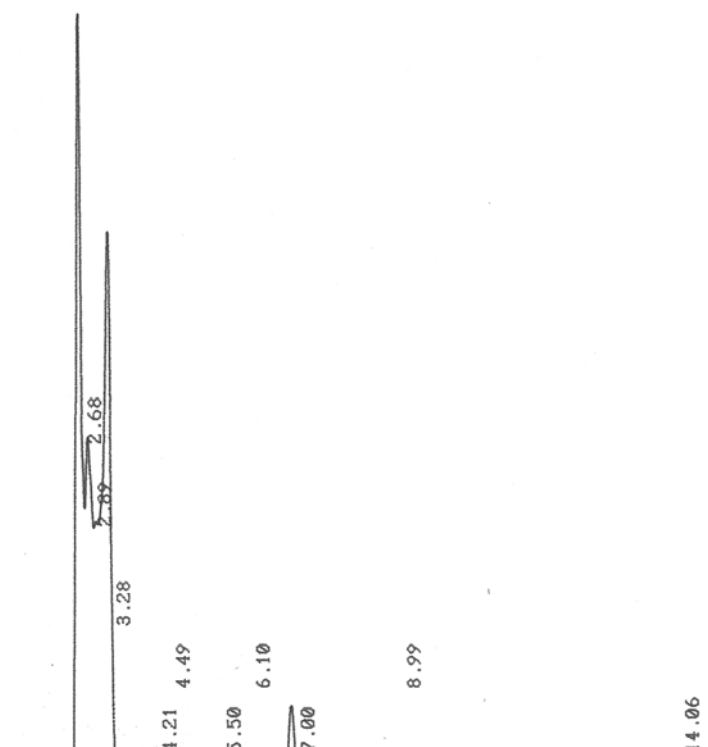


Figure 1. Chromatogramme obtenue pour l'étalon de acide ascorbique 0,10392 mg/mL (dilue 1/10, l'aire d'étalon 316,956)

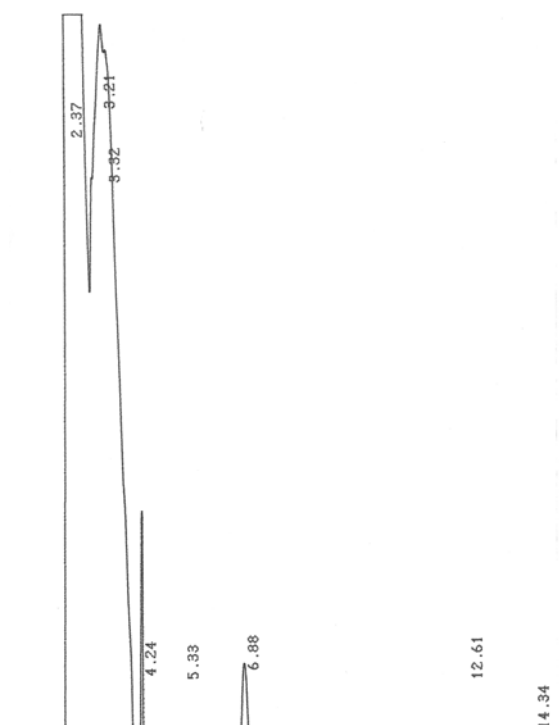


Figure 2. Chromatogramme obtenue pour l'échantillon de acide ascorbique (1mL, dilue 1/4, l'aire d'échantillon 407,201)

Après l'analyse, la valeur obtenue a été 53,20 mg/mL. Le calcul s'effectue comme ça :

$$\text{Concentration en vitamine C} = \frac{407201}{316956} \times 0,10392 \times \frac{100}{1} \times \frac{4}{1} = 53,20 \text{ mg/mL}$$

CONCLUSIONS

Il existe dans la littérature un nombre considérable et une grande variété de méthodes de dosage et d'identification de vitamine C.

Les méthodes titrimétriques sont simples d'utiliser, on rencontre des difficultés même avec titrants communément utilisés. Les problèmes supplémentaires sont rencontrés surtout avec les échantillons colorés ou en présence des substances réduisant qui peuvent décolorer le colorant et rendre l'analyse non spécifique. Les colorants mangeables comme l'amarante, l'indigotine ou le tétrazène présentés dans les produits pharmaceutiques ont besoin de l'enlèvement par l'échange d'ion ou par l'adjonction de charbon de bois. Des telles restrictions ont encouragé des chimistes à chercher de meilleures méthodes alternatives.

La CLHP couplée à la détection par absorption UV revêt un potentiel intéressant et serait la technique la plus compatible avec la quantification de vitamine C dans les préparations pharmaceutiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. *Farmacopeea Româna*, ed X, Editura Medicala, Bucarest, **1993**.
2. *British Pharmacopoeia*, 5th ed., HM Stationery Office, London, **1988**.
3. Murty, N.K., Rao, K.R.: *J. Ind. Chem. Soc.*, **1976**, **53**, 532.
4. Verma, K.K., Gulati, A.K.: *Anal. Chem.*, **1980**, **52**, 24.
5. Svehla, G., Kolai, L., Erdy, L., *Anal. Chim. Acta*, **1963**, **29**, 442.
6. Erdy, L., Svehla, G.: *Chemist-Analyst*, **1963**, **52**, 24.
7. *Indian Pharmacopoeia*, Photolithio Press, Faridabad, **1985**, p. 49.
8. Basford, R.E., Heunkens, F.M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, **77**, 3873.
9. Overberger, C.G., Bosignore, P.V.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, **80**, 5431.
10. Pandey, N.K., Mishra, K.K.: *Indian J. Chem.*, in press.
11. Pandey, N.K., Mishra, K.K., Kashyap, M.J.: *Phosphorus Sulfur*, in press.
12. Lawendel, J.S.: *Nature (London)*, **1956**, **178**, 873.
13. Szepesy, A., *Acta pharm. hung.*, **1966**, **36**, 280.
14. Doner, L.D., Hicks, K.B.: *Anal. Biochem.*, **1981**, **115**, 225.
15. Yoshida, M., Nishimune, T., Sureki, K. : *Korean J. Pharmacol.*, **1992**, **28**, 53.
16. Sapers, G.M., Douglas Jr., F.W., Ziolkowski, M.A., Miller, R.I., Hicks, K.B. : *J. Chromatogr.*, **1990**, **503**, 431.
17. Rose, R.C., Nahrwold, D.L.: *Anal. Biochem.*, **1980**, **114**, 140.