

12. Солдатенков А.Т. Основы органической химии лекарственных веществ / А.Т. Солдатенков, Н.М. Колядина, И.В. Шендрик. – М.: Химия, 2001.– 1920 с.

РОЗРОБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦІЇ 4-(2-МЕТИЛФЕНІЛ)АМІНО-1-ФЕНІЛ-1,5-ДИГИДРОПІРРОЛ-2-ОНА

В. А. Зубков, С. Г. Таран, З. Г. Еремина, О. В. Кизь, О. Л. Каменецкая

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: исследованы спектральные характеристики и химические свойства потенциального НПВС-4-(2-метилфенил)амино-1-фенил-1,5-дигидропирурол-2-она. Предложены методики идентификации и количественного определения данного соединения.

Ключевые слова: 4-(2-метилфенил)амино-1-фенил-1,5-дигидропирурол-2-он, идентификация, количественное определение.

THE METHODS OF STANDARDIZATION OF 4-(2-METHYLPHENYL)AMINO-1-PHENYL-1, 5-DI-HYDROPIRROL-2-ONE.

V. O. Zubkov, S. H. Taran, Z. H. Yeriomina, O. V. Kiz, O. L. Kamenetska

National Pharmaceutical University, Kharkiv

Summary: the spectral characteristics and chemical properties of 4 (2-methylphenyl)amino-1-phenyl-1,5-dihydropyrrol-2-one as the potential of NSAIDs substance have been investigated. The methods of identification and assay of this compound have been elaborated and proposed.

Key words: 4 (2-methylphenyl)amino-1-phenyl-1,5-dihydropyrrol-2-one, identification, quantification.

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. В. В. Петренко

УДК 543.42+535.24:547.96-615.451+615.453.6

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІЦИНУ У ТАБЛЕТКАХ, ЩО МІСТЯТЬ ГЛІЦИН ТА ДЕЯКІ РОСЛИННІ ЕКСТРАКТИ

© **Л. С. Логойда, Л. В. Вронська, А. Є. Демид, М. М. Михалків**

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Резюме: розроблено методику кількісного визначення гліцину у таблетках, що містять гліцин та деякі рослинні екстракти. Вивчено основні валідаційні характеристики методики, в основі якої лежить реакція взаємодії гліцину з нінгідрином.

Ключові слова: гліцин, нінгідрин, кількісне визначення, валідаційні характеристики.

Вступ. При розробці складу та технології нових лікарських засобів, незалежно від виду лікарської форми, технологую необхідні методи контролю вмісту речовин, які є активними

фармацевтичними інгредієнтами. Нами розроблений склад та технологія таблеток стреспротекторної дії на основі деяких рослинних екстрактів та гліцину [1]. Для контролю вмісту гліци-

ну в технологічному процесі і на час випуску, а також в процесі зберігання, необхідно було розробити методику його кількісного визначення.

Кількісне визначення окремих індивідуальних амінокислот проводять методом неводної ацидиметрії, методом алкаліметрії за Серенсом (формольне титрування) та іншими методами [2], проте вони не можуть бути використані для визначення вмісту гліцину у нашому випадку, оскільки розроблений препарат є комбінованим, містить складний комплекс біологічно активних речовин екстрактів та низку допоміжних речовин.

Кількісне визначення амінокислот, пептидів і білків різної будови та складу описано в численних роботах закордонних вчених [3-5] спектрофотометричним методом у видимій ділянці спектра. Всі вони досліджують реакцію утворення синьо-фіолетового забарвлення продукту при взаємодії амінокислот з нінгідрином. Згідно з наведеними даними, залежно від будови амінокислот і природи об'єкта, в якому визначається досліджувана амінокислота, необхідне використання різних буферів, різної пробопідготовки досліджуваних зразків, різного – водного та неводного – середовища проведення реакції отримання фотометрованої сполуки нінгідрину з амінокислотами. Разом з тим, у доступній нам літературі ми не знайшли методик кількісного визначення гліцину за допомогою цієї фотометричної реакції, напевно, в зв'язку з обмеженням його застосуванням у формі монопрепаратів.

Тому метою нашої роботи була розробка методики кількісного визначення гліцину у таблетках, що містять гліцин та деякі рослинні екстракти та вивчення її валідаційних характеристик.

Методи дослідження. Об'єктом дослідження були таблетки, до складу яких входить гліцин та деякі рослинні екстракти. У роботі використовували спектрофотометричний метод аналізу. Вимірювання проводили на спектрофотометрі Carry – 50 M.

Як стандарт застосовували фармакопейний стандартний зразок (ФСЗ) гліцину, як фотометричний реагент – нінгідрин $C_9H_4O_3 \cdot H_2O$ кваліфікації "чда". Розчини точної концентрації гліцину та розчини нінгідрину різних концентрацій готували на воді очищеній.

Результати й обговорення. З метою розробки методики кількісного визначення гліцину ми розглянули можливість застосування методів спектрофотометрії і ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія). Попередні спектрофотометричні дослідження розчинів гліцину у воді підтвердили теоретичні припущення щодо неможливості його детектування і визначення, через відсутність у складі молекули

хромофорів для УФ чи видимої ділянок спектра. Тому є неможливим визначення гліцину методом прямої спектрофотометрії чи методом ВЕРХ із спектрофотометричним детектором, який у більшості випадків застосовують сьогодні виробники лікарських засобів. Як найпростіша амінокислота, гліцин не має здатності обертати площину поляризації поляризованого світла, що унеможливило використання методу поляриметрії. В зв'язку з цим ми зупинили свій вибір на спектрофотометрії з використанням відомої і використовованої фотометричної реакції утворення забарвленої сполуки амінокислоти з нінгідрином [2].

У вибраних нами умовах кількісного визначення в електронному спектрі поглинання, отриманого у фотометричній реакції забарвленого продукту, спостерігається поява двох смуг поглинання при (400 ± 2) нм і (570 ± 2) нм (рис. 1). Обидві смуги мають практично однакові питомі показники поглинання, але з точки зору специфічності визначення аналітичною смугою є максимум при довжині хвилі (400 ± 2) нм, оскільки має меншу ширину смуги, а отже, вищу селективність.

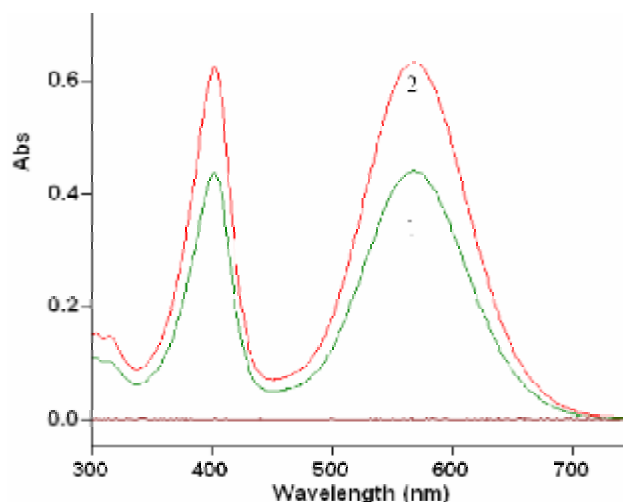


Рис. 1. Електронні спектри поглинання водних розчинів гліцину з нінгідрином в умовах кількісного визначення: 1 – для стандартного розчину гліцину (розчин порівняння), 2 – для водного вилучення з таблеток (випробуваний розчин).

Методика кількісного визначення гліцину в таблетках

Випробовуваний розчин. 0,47 г (точна наважка) порошку розтертих таблеток поміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мл води очищеної Р, розчиняють протягом 5-10 хв при нагріванні на водяній бані при температурі 50 °С. Охолоджують і доводять об'єм розчину водою очищеною Р до 100 мл і перемішують.

Отриманий розчин фільтрують через паперовий фільтр „червона стрічка”, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. До 1 мл фільтрату, поміщеного у пробірку, додають 1,1 мл 0,2 % розчину нінгідрину Р і нагрівають в киплячій водянній бані протягом 20 хв. Після повного охолодження розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл і розбавляють водою до позначки, перемішують. Через 1 год вимірюють оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі (400 ± 2) нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Розчин порівняння. 0,0716 г ФСЗ гліцину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мл води очищеної Р, розчиняють протягом 5-10 хв при нагріванні на водянній бані при температурі 50 °С. Охолоджують і доводять об'єм розчину водою очищеною Р до 100 мл і перемішують.

До 1 мл отриманого розчину додають 1,1 мл 0,2 % розчину нінгідрину Р і нагрівають в киплячій водянній бані протягом 20 хв. Після повного охолодження розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл і розбавляють водою до позначки, перемішують. Через 1 год вимірюють оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі (400 ± 2) нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Компенсаційний розчин. 1 мл води очищеної Р поміщають у пробірку, додають 1,1 мл 0,2 % розчину нінгідрину Р і нагрівають в киплячій водянній бані протягом 20 хв. Після повного охолодження розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл і розбавляють водою до позначки, перемішують.

Приготування 0,2 % розчину нінгідрину Р 0,1 г нінгідрину поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 30 мл води очищеної Р, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки і перемішують.

Вміст гліцину в таблетці, у відсотках, рахуючи на середню масу таблетки, розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_0 \cdot A_x \cdot b \cdot 100}{m_x \cdot A_0 \cdot a}$$

де X – вміст гліцину в таблетці, у грамах;

m_0 – маса наважки ФСЗ гліцину, у грамах;

m_x – маса наважки таблетної маси, у грамах;

A_x – оптична густина випробовуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину ФСЗ гліцину;

a – вміст гліцину в одній таблетці, вказаний в “Складі”, у грамах;

b – середня маса таблетки, у грамах.

Вміст гліцину в таблетці повинен бути в межах 92,5-107,5 % від декларованого вмісту, відповідно до вимог ДФУ.

Відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ), методики кількісного визначення лікарських засобів мають бути валідовані. Валідація розробленої методики “кількісне визначення” для готового лікарського засобу – таблеток, до складу яких входить гліцин, була проведена за основними валідаційними характеристиками з використанням фармакопейного стандартного зразка гліцину методом “введено-знайдено” [6, 7].

Розроблена методика аналізу, що валідується, є специфічною, бо в умовах експерименту забарвлена сполука утворюється тільки з гліцином.

Дослідження специфічності методики. При фотометруванні розчину, отриманого з водного вилучення модельної таблетної суміші, що містила рослинні екстракти і допоміжні речовини, і підготовленого аналогічно випробовуваному розчину, не спостерігалось поглинання при довжині хвилі поглинання забарвленої сполуки гліцину з нінгідрином (400 ± 2) нм). Тобто, плацебо аналізованих таблеток в умовах кількісного визначення не дає смуг поглинання, а отже, не впливає на оптичну густину продукту реакції гліцину з нінгідрином під час кількісного визначення.

Дослідження лінійності методики. Лінійність вивчали в межах 50-150 % від номінальної концентрації гліцину. Розчини з точно відомою концентрацією отримували шляхом розведення відповідного стандартного розчину і проводили визначення за загальною методикою. На основі отриманих даних будували графік залежності оптичної густини від концентрації гліцину у нормалізованих координатах та розраховували параметри лінійності (табл. 1).

Розрахунок параметрів лінійної залежності (за даними табл. 1) для гліцину був проведений методом найменших квадратів, відповідно до вимог ДФУ [5, 6]. У результаті проведених досліджень встановлено, що методика характеризується строгою лінійністю: коефіцієнт кореляції більший 0,9968 (критеріальне значення), невелике залишкове стандартне відхилення в широкіх межах (від 50 до 150 % у нормалізованих координатах). Графік залежності оптичної густини розчину від концентрації проходить практично через початок координат (точка перетину з віссю ординат - 0,1871), що вказує на відсутність впливу фону чи допоміжних речовин на оптичну густину досліджуваних розчинів в даних умовах, а розрахований довірчий інтервал константи D_a підтверджує статистичну і практичну незначущість константи a.

Дослідивши лінійність методики в межах від 50 до 150 % від номінального вмісту гліцину, можна стверджувати, що розроблена методика витримує вимоги ДФУ щодо *діапазону застосування* – для кількісного визначення лікарських

Таблиця 1. Результати дослідження лінійності методики кількісного визначення гліцину

№ за/п	$C_i \times 10^4$ %	$C_{\text{норм.}}$ %	$A_{\text{вимір.}}$	$A_{\text{норм.}}$	Критеріальні вимоги і прийнятність	
1	3,58	50,00	0,223	49,88	Рівняння прямої: $A_{\text{норм.}} = 1,0044 \cdot C_{\text{норм.}} - 0,1871$ Тангенс кута нахилу: $b = 1,0044$ Точка перетину з віссю ординат: $a = -0,1871$ Коефіцієнт кореляції: $r = 0,99993$	
2	5,01	69,97	0,315	70,47		
3	6,44	89,94	0,402	89,93		
4	7,16	100,00	0,447	100		
5	7,88	110,06	0,496	110,96		
6	9,31	130,03	0,580	129,75		
7	10,74	150,00	0,674	150,78		
Коефіцієнт кореляції: $r = 0,99993$					$r > 0,9968$	виконується
Залишкова дисперсія $S_0^2 = 0,2366$					$S_0/b \leq 0,9336$	виконується
Залишкове стандартне відхилення $S_0 = 0,4864$						
Довірчий інтервал константи a : $\Delta_a = 1,5722$ $a = -0,1871$					$> a $ $\leq 1,536$	виконується за критеріями статистичної практичної незначущості і

субстанцій або лікарських форм від 80 до 120 % від номінального вмісту.

Дослідження прецизійності (збіжності). Прецизійність виражає ступінь близькості або ступінь розкиду результатів для серії вимірів, виконаних за даною методикою на різних пробах одного і того самого однорідного зразка. В таблиці 2 наведено результати дослідження правильності і збіжності методики. Отримані результати вказують на збіжність методики, тобто про її прийнятну точність, оскільки ні один з результатів за величиною похибки не вишов більше, ніж на 2,4 % (повна невизначеність ре-

зультату аналізу $D_{\text{As}} = 2,4$ при відхиленнях вмісту згідно з вимогами ДФУ $\pm 7,5$ %).

Дослідження правильності. Випробування проводили на стандартних розчинах гліцину методом "введено-знайдено". Результати випробування наведені в таблиці 2. Як впливає з наведених результатів, виконується критерій практичної незначущості систематичної похибки, що вказує, що остання є незначущою порівняно з максимально допустимою невизначеністю аналізу.

Таким чином, розроблена нами методика кількісного визначення гліцину відповідає кри-

Таблиця 2. Результати випробування методики кількісного визначення гліцину на правильність і збіжність

№ за/п	$C_{\text{і введено}}$ %	$C_{\text{і знайдено}}$ %	$Z = C_{\text{і знайдено}} \cdot 100 / C_{\text{і введено}}$ %
1	50,00	49,88	99,76
2	69,97	70,47	100,71
3	89,94	89,93	99,99
4	100	100	100,00
5	110,06	110,96	100,82
6	130,03	129,75	99,78
7	150,00	150,78	100,52
Середнє арифметичне, \bar{Z}			100,23
Відносне стандартне відхилення, S_z %			0,46
Відносний довірчий інтервал, Δ_z %			0,45
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_z \% \leq 2,4$			виконується
Критерій практичної незначущості систематичної похибки $\delta \% = \bar{Z} - 100 \leq 0,32 \cdot \Delta_{\text{As}}$		$\leq 0,768$	виконується
Загальний висновок про методику			коректна

теріям специфічності, лінійності, діапазону застосування, збіжності та правильності і може застосовуватись для кількісного визначення гліцину у таблетках, що містять гліцин та деякі рослинні екстракти.

Висновки. Розроблена спектрофотометрична методика кількісного визначення гліцину у таблетках, що містять гліцин та деякі рослинні

екстракти. Проведена її часткова валідація, а саме досліджені специфічність, лінійність, діапазон застосування, точність (збіжність) і правильність. Оскільки виконуються критерії прийнятності стосовно цих валідаційних характеристик відповідно до вимог ДФУ, то методика може використовуватись для визначення вмісту гліцину в таблетках.

Література

1. Чекалюк Л. С. До питання стандартизації комплексного лікарського засобу на основі екстрактів валеріани і меліси та гліцину // Матеріали XIII міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених. – Тернопіль, 2009. – С. 229.
2. Фармацевтическая химия. В 2 ч.: Учебн. Пособие / В. Г. Беликов – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 624 с.
3. C. Magne, Francois Larher. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of aminoacids and free proline // Analytical Biochemistry. – 1992. – Vol. 200 (1). – P. 115–118.
4. Brent R. Larsen, E. P. Lazzari and D. M. Desiderio. Products from the reaction of ninhydrin with triphenylalanine // Analytical Biochemistry. – 1978. – Vol. 86 (1). – P. 127–132.
5. Sabina Prochazkova, Kjell M. Varum, Kjetill Ostgaard. Quantitative determination of chitosans by ninhydrin // Carbohydrate Polymers. – 1999. – Vol. 38 (2). – P. 115–122.
6. Державна фармакопея України. – 1-е вид. – Х.: PIPEГ, 2001. – 556 с.
7. Державна фармакопея України. – 1-е вид. Доповнення 1. – Х.: PIPEГ, 2004. – 494 с.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИЦИНА В ТАБЛЕТКАХ, КОТОРЫЕ СОДЕРЖАТ ГЛИЦИН И НЕКОТОРЫЕ РАСТИТЕЛЬНЫЕ ЭКСТРАКТЫ

Л. С. Логойда, Л. В. Вронска, А. Е. Демид, М. Н. Михалкив

Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

Резюме: разработана методика количественного определения глицина в таблетках, которые содержат глицин и некоторые растительные экстракты. Изучены основные валидационные характеристики методики, в основе которой лежит реакция взаимодействия глицина с нингидрином.

Ключевые слова: глицин, нингидрин, количественное определение, валидационные характеристики.

GLYCINE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION IN TABLETS WHICH CONTAIN GLYCINE AND SOME VEGETABLE EXTRACTS

L. S. Lohoyda, L. V. Vronska, A. Ye. Demyd, M. M. Mykhalkiv

Ternopil State Medical University by I.Ya. Horbachevsky

Summary: the technique of glycine quantitative determination in tablets which contain glycine and some vegetable extracts has been developed. The basic validation characteristics of technique, which form the basis of interaction between glycine and ninhydrin have been studied.

Key words: glycine, ninhydrin, quantitative determination, validation characteristics.