

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІЦИНУ В ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ ЗА РЕАКЦІЄЮ З 2,3-ДИХЛОР-1,4-НАФТОХІНОНОМ

Ключові слова: спектрофотометрія, кількісне визначення, гліцин, 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон, валідація

Оскільки популярність ноотропів продовжує набирати оберти, фармацевтичний ринок цих лікарських препаратів невпинно розширюється, перед системою охорони здоров'я постає значна проблема щодо своєчасного, експресного та належного контролю якості лікарських засобів.

Так, фармакопея Сполучених Штатів та Британська фармакопея пропонують титриметричний спосіб кількісного визначення гліцину в субстанції, а саме ацидиметрію у неводному середовищі з індикаторним (розчином кристалічного фіолетового) або потенціометричним фіксуванням кінцевої точки титрування [1, 2]. В джерелах літератури описано спектрофотометричні методи аналізу амінокислот із первинною аміногрупою на основі їх взаємодії з розчинами о-фталевого альдегіду, за присутності 2-меркаптоетанолу, нінгідрину [3], 2,4,6-тринітробензену. Розроблено непрямий метод визначення амінокислот у субстанції за реакцією з купрум(II) фосфатом. Надається інформація щодо спектрофотометричних методик, які ґрунтуються на утворенні забарвлених сполук із розчинами хлоранілу (тетрахлорхінон), флуоранілу (тетрафлуорхінон), 1,2,4-тригідроксоантрахінону [4], п-бензохінону, натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти [5]. Існує метод спектрофотометричного визначення у видимій ділянці спектра деяких амінокислот (зокрема гліцину) на основі їх взаємодії (як донорів електронів) з розчином 7,7',8,8'-тетраціанохінониметану (π -акцептор) у середовищі ацетонітрилу за температури 70 °С [6].

Незважаючи на високу точність титриметричних методів аналізу, для визначення лікарських речовин у лікарських препаратах частіше застосовують інструментальні методи аналізу як більш чутливі. Деякі із запропонованих спектрофотометричних методів потребують недоступних реагентів, є недостатньо чутливими, інші – важкі у виконанні або пропонуються лише для субстанцій. Тому, доцільність розроблення нових, простих, валідних методик кількісного визначення гліцину саме в лікарських формах не викликає сумніву.

Метою роботи є встановлення оптимальних умов перебігу реакції між гліцином та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном та розроблення валідної, чутливої, простої у виконанні методики кількісного визначення гліцину у фармацевтичних препаратах.

Матеріали та методи дослідження

Об'єкти дослідження – лікарські препарати: порошок у пакетиках (саше) по 7,0 г гліцину Медихронал-Дарниця (ПАТ «Дарниця», Україна), серія FD150913; таблетки по 0,10 г гліцину – Гліцисед (Корпорація «Артеріум», Україна), серія 52386 та Гліцин (ТОВ «МНВК «Біотики»», Росія), серія 0940413; капсули по 0,50 г гліцину Доппельгерц актив Гліцин + В-вітаміни (Queisser Pharma GmbH & Co, Німеччина), серія L010014.

Як реактив та розчинник використовували 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон кваліфікації «х. ч.», диметилформамід (ДМФА) кваліфікації «ч. д. а.», воду очищену. Як стандарт використовували робочий стандартний зразок (РСЗ) гліцину.

Дослідження виконували на спектрофотометрі Specord 200 (Німеччина). Використовували ваги електронні АВТ-120-5 ДМ (Німеччина), мірний посуд класу А.

Загальна методика кількісного визначення гліцину: точну наважку гліцину (0,1200–0,2000 г) вміщують у мірну колбу ємністю 25,00 мл, розчиняють у 7,00 мл води очищеної, доводять ДМФА до позначки, перемішують. 1,00 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу ємністю 25,00 мл, додають 2,50 мл 1,0%-го розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону, перемішують. Одержану реакційну суміш нагрівають на водяній бані 15 хв за температури 95 °С, охолоджують, доводять ДМФА до позначки. Оптичну густину вимірюють на фоні компенсаційного розчину, який не містить досліджуваної речовини, за довжини хвилі 470 нм.

Методика визначення гліцину в лікарських формах: у разі визначення гліцину в капсулах Доппельгерц актив Гліцин + В-вітаміни та таблетках Гліцин, Гліцисед точну наважку капсульної (0,0325–0,0525 г) або таблеткової (0,0321–0,0494 г) маси вміщують у мірну колбу ємністю 25,00 мл, розчиняють у 7,00 мл води очищеної, доводять ДМФА до позначки, одержаний розчин за необхідності фільтрують. У разі визначення гліцину в пакетиках Медихронал-Дарниця весь вміст саше (7,0 г гліцину) переносять у мірну колбу на 500,0 мл, розчиняють у 7,00 мл води очищеної, доводять ДМФА до позначки, перемішують. Одержаний розчин (10,00 мл) вміщують у мірну колбу ємністю 100,0 мл, доводять ДМФА до позначки, перемішують. 1,00 мл одержаних розчинів вміщують у мірну колбу ємністю 25,00 мл, додають 2,50 мл 1,0%-го розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону, перемішують. Одержану реакційну суміш нагрівають на водяній бані (95 °С, 15 хв), охолоджують та доводять ДМФА до позначки. Паралельно виконують дослід з 1,00 мл розчину порівняння (0,16% РСЗ гліцину). Абсорбцію досліджуваного розчину та розчину порівняння вимірюють на фоні компенсаційного розчину, що не містить досліджуваної речовини, за довжини хвилі 470 нм. Розрахунок кількісного вмісту гліцину в лікарських формах здійснюють за типовою формулою.

Результати дослідження та обговорення

Вибір оптимальних умов перебігу реакції гліцину з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном

Для розроблення методик кількісного визначення гліцину на основі реакції з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном вивчали фактори, що впливають на характер спектра поглинання та повноту утворення продуктів реакції (за величиною оптичної густини), зокрема природу розчинника, кількість реагенту, час та температуру нагрівання, стійкість продуктів реакції в часі.

Експериментально встановлено, виходячи з величин оптичної густини та розчинності реагуючих компонентів, що оптимальним середовищем для проведення реакції є вода–ДМФА та нагрівання на водяній бані. Оптимальний час нагрівання (15 хв) та кількість доданого 1,0%-го реагенту (2,50 мл) встановлювали експериментально за максимальною оптичною густиною (А) (рис. 1, 2).

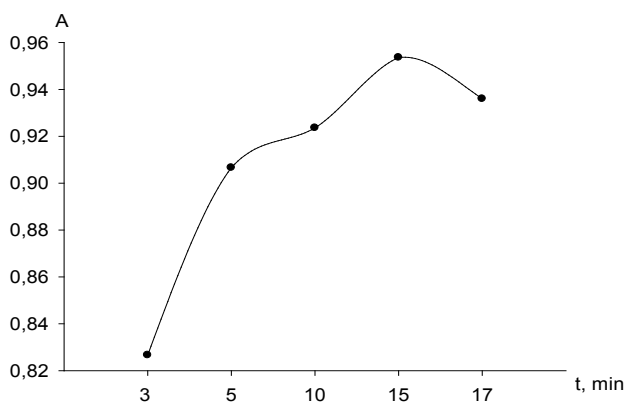


Рис. 1. Залежність оптичної густини від часу нагрівання реакційної суміші за 95 °С

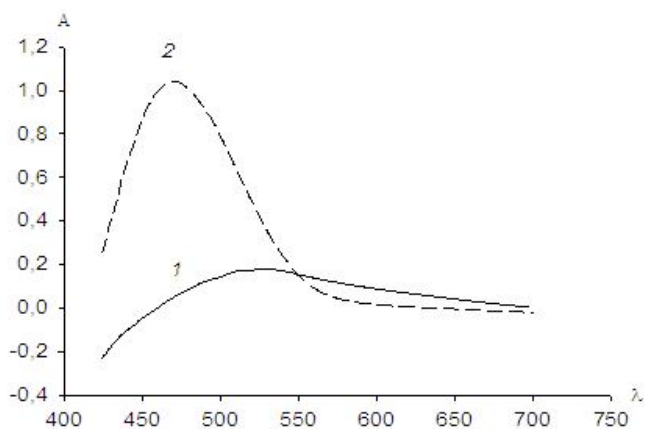


Рис. 2. Спектри поглинання:

1 – розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону; 2 – продукту реакції гліцину з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном

Розраховані значення молярного коефіцієнту ($1,1 \cdot 10^3$) та межі виявлення (3,2 мкг/мл) свідчать про достатньо високу чутливість реакції запропонованого реагенту з досліджуваною лікарською речовиною.

Експериментально встановлені оптимальні умови перебігу реакції гліцину з розчином 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону покладено в основу розроблення методики кількісного визначення цієї лікарської речовини у складі фармацевтичних препаратів.

Визначення основних валідаційних характеристик

Лінійність визначали у межах 80–120% від номінальної концентрації гліцину. Під час визначення лінійності готували 0,16%-й розчин РСЗ у колбі ємністю 25,00 мл відповідно до загальної методики кількісного визначення гліцину, який у подальшому використовували для одержання п'яти розведень [7]. Абсорбцію одержаних розчинів вимірювали за 470 нм та будували графік залежності абсорбції від концентрації гліцину (рис. 3). Числові показники лінійної залежності розраховували за допомогою регресійного аналізу методом найменших квадратів [8]: коефіцієнти b , a , стандартні відхилення s_b , s_a , залишкове стандартне відхилення $s_{x,0}$ (%) і коефіцієнт кореляції r (табл. 1).

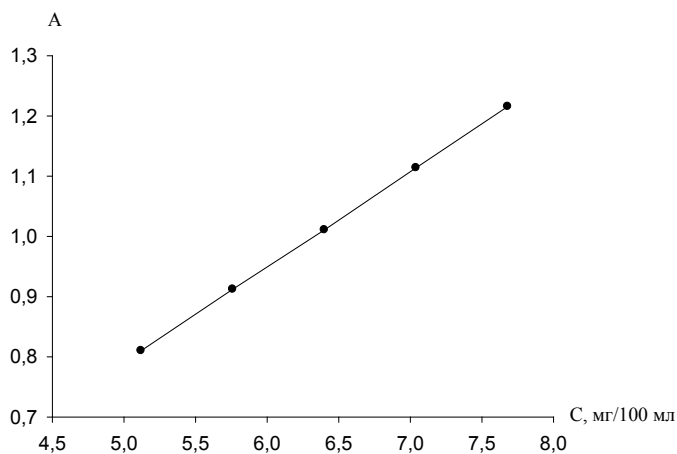


Рис. 3. Графік залежності оптичної густини від концентрації гліцину

**Основні параметри лінійної залежності оптичної густини від
концентрації гліцину**

Величина	Значення	Критерії	Висновок
$b \pm (s_b)$	$0,1583 \pm 0,0006$	–	–
$a \pm (s_a)$	$0,0039 \pm 0,0004$	$a \leq \Delta a = t(95\%; 3) \cdot S_a = 0,0004$	Відповідає
$s_{x,0}(\%)$	0,118	$\leq \Delta_{As}(\%)/t(95\%; 3) = 1,360$	Відповідає
r	1,000	$\geq 0,9560$	Відповідає

Прецизійність методики визначали для кожної лікарської форми на рівні збіжності [7]. Для цього в кожному разі здійснювали 9 паралельних визначень (3 наважки, 3 повтори), а за результатами розраховували метрологічні характеристики (табл. 2).

Встановлено, що в усіх випадках однобічний довірчий інтервал $\Delta_{x,r}$ не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу $\Delta_{A,s}\%$, тому методика є точною на рівні збіжності.

**Визначення точності результатів кількісного визначення гліцину
в готових лікарських формах ***

Лікарський препарат	Метрологічні характеристики					
	\bar{X}	S	RSD	$\Delta_{x,r}$	$\Delta_{x,r}^-$	$\Delta_{A,s}\%$
Порошок у пакетиках Медихронал-Дарниця: гліцину 7,0 г	7,01	$3,37 \cdot 10^{-3}$	0,481	0,895	0,298	3,20
Таблетки Гліцин: гліцину 0,10 г	0,100	$1,68 \cdot 10^{-3}$	1,68	3,12	1,04	3,20
Таблетки Гліцисед: гліцину 0,10 г	0,100	$1,22 \cdot 10^{-3}$	1,22	2,28	0,759	3,20
Капсули Доппельгерц: гліцину 0,50 г	0,503	$4,60 \cdot 10^{-3}$	0,914	1,70	0,567	3,20

П р и м і т к а: * – $n = 9, P = 0,95$.

Згідно з ДФУ, правильність результатів встановлювали методом добавок. Методика є правильною, тому що виконується умова $|\bar{Z} - 100| \leq \Delta_{\bar{Z}}$, систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, тобто справжнє значення величини, що визначається, знаходиться в межах свого довірчого інтервалу [7]. Одержані дані наведено в табл. 3.

**Визначення правильності результатів кількісного визначення
гліцину у готових лікарських формах**

Лікарський препарат	Метрологічні характеристики				
	$\bar{Z}, \%$	$RSD, \%$	$ \bar{Z} - 100 $	Δz	$\Delta \bar{z}$
Порошок у пакетиках Медихронал-Дарниця: гліцину 7,0 г	99,68	1,56	0,320	2,91	0,972
Таблетки Гліцин: гліцину 0,10 г	99,78	0,358	0,220	0,669	0,223
Таблетки Гліцисед: гліцину 0,10 г	98,94	1,70	1,06	3,18	1,06
Капсули Доппельгерц: гліцину 0,50 г	99,61	0,917	0,390	1,70	0,569

Діапазоном застосування аналітичної методики є інтервал між мінімальною та максимальною концентраціями досліджуваної речовини, для якого встановлено, що

методика має потрібну лінійність, правильність та прецизійність. За результатами виконаних досліджень, діапазон застосування для розробленої методики становить 77–123% та знаходиться у межах робочих інтервалів для методик кількісного визначення згідно з вимогами ДФУ (80–120%) [7].

Оцінку *робасності* здійснювали на стадії розроблення методики та визначали стабільність аналітичних розчинів у часі. Було встановлено, що досліджувані забарвлені розчини стійкі не менше 60 хв.

В и с н о в к и

1. Експериментально встановлено, що гліцин взаємодіє з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном у середовищі вода–ДФУ за нагрівання реакційної суміші на водяній бані (95 °С, 15 хв). Реакція достатньо чутлива, межа виявлення становить 3,20 мкг/мл.

2. Розроблено чутливу, економічну, зручну спектрофотометричну методику кількісного визначення гліцину в 4 лікарських препаратах (саше Медихронал-Дарниця, таблетках Гліцин та Гліцисед, в капсулах Доппельгерц актив Гліцин + В-вітаміни).

3. Доведено, що розроблена методика кількісного визначення за такими характеристиками як лінійність, прецизійність, правильність, діапазон застосування та робасність є валідною, відзначається простотою виконання та доступністю і може бути застосована в контролі якості лікарських засобів.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. United States Pharmacopeia 26. – USP Convention Inc. – Rockville, 2003.
2. British Pharmacopeia. – Her Majesty's Stationery Office. – London, 2000.
3. Ошкая В. П. Нингидриновые реакции. – Рига: Зинатне, 1974. – 176 с.
4. Snežana S. Mitić, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić et al. Quantitative determination of glycine in commercial dosage forms by kinetic spectrophotometry // J. Anal. Chem. – 2009. – V. 64. – P. 683–689.
5. Hasani M., Yaghoubi L., Abdollahi H. A kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of glycine and lysine by artificial neural networks // Anal. Biochem. – 2007. – V. 365, N 1. – P. 74–81.
6. Theia'a N. Al-Sabha, Najwa M. Al-Karemy. Spectrophotometric determination of some amino acids using 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane reagent // J. Anal. Chem. – 2007. – V. 3. – P. 190–195.
7. Державна фармакопея України. 1-ше вид., доп. 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
8. Державна фармакопея України. 1-ше вид., доп. 1. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2004. – 520 с.

Надійшла до редакції 11. 03. 2015.

Е. П. Портная, С. А. Васюк

Запорожский государственный медицинский университет

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИЦИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ ПО РЕАКЦИИ С 2,3-ДИХЛОР-1,4-НАФТОХИНОНОМ

Ключевые слова: спектрофотометрия, количественное определение, глицин, 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон, валидация

А Н Н О Т А Ц И Я

Источники литературы предлагают большое количество как титриметрических, так и оптических методов анализа глицина. Некоторые из описанных методов требуют недоступных реагентов, предложены лишь для субстанций, другие – сложны в исполнении либо недостаточно чувствительны. Поэтому актуальность разработки нового, простого, чувствительного, валидного метода анализа глицина не вызывает сомнений. Целью работы была разработка новой спектрофотометрической методики определения глицина по реакции с 2,3-дихлор-1,4-нафтохиноном в лекарственных формах.

Объекты исследования – лекарственные препараты: порошок в пакетиках (саше) Медихронал-Дарниця (ЧАО «Дарниця», Украина) по 7,0 г глицина; таблетки по 0,10 г глицина – Глицисед (Корпорация «Артериум», Украина) и Глицин (ООО «МНВК «Биотики»», Россия); капсулы по 0,50 г глицина Доппельгерц актив Глицин + В-витамины (Queisser Pharma GmbH & Co, Германия).

Исследования проводили на спектрофотометре Specord 200 (Германия).

Общая методика количественного определения глицина: точную навеску глицина (0,1200–0,2000 г) помещают в мерную колбу объемом 25,00 мл, растворяют в 7,00 мл воды очищенной, доводят ДМФА до метки, перемешивают. 1,00 мл полученного раствора переносят в мерную колбу объемом 25,00 мл, добавляют 2,50 мл 1%-го раствора 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона, перемешивают. Полученную реакционную смесь нагревают на водяной бане (15 мин, 95 °С), охлаждают, доводят ДМФА до метки. Оптическую плотность измеряют на фоне компенсационного раствора, который не содержит исследуемого вещества, при 470 нм. Реакция достаточно чувствительна, определяемый минимум составляет 3,20 мкг/мл.

Разработана чувствительная, экономичная, удобная спектрофотометрическая методика количественного определения глицина в 4 лекарственных препаратах. Доказано соответствие разработанной методики требованиям ГФУ согласно таким основным валидационным характеристикам – линейность (коэффициент корреляции $r = 1,000$), точность, правильность, диапазон применения (77–123%), робастность. Полученные статистические показатели свидетельствуют о достаточно высокой точности и корректности предложенной методики, а также возможности ее применения в лабораториях контроля качества лекарственных средств и ОТК химико-фармацевтических предприятий.

K. P. Portna, S. O. Vasyuk

Zaporizhzhia State Medical University

QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLYCINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS BY REACTION WITH 2,3-DICHLOR-1,4-NAPHTHOQUINONE REAGENT

Key words: spectrophotometry, analysis, glycine, dichlorone, validation studies

ABSTRACT

Glycine has been reported to be determined by different techniques including titrimetric methods, VIS spectrophotometry. Some of the proposed methods require inaccessible reagents, others – difficult in execution or offered only for substances. That is why, feasibility of developing new, simple, valid methods for the glycine quantitative determination in medical forms is not in doubt.

This paper presents a new, simple and accurate VIS spectrophotometric method for determining of glycine in pharmaceutical formulation using 2,3-dichlor-1,4-naphthoquinone as a reagent.

Pharmaceutical preparations: capsules of Doppel Herz, 0,50 g (Queisser Pharma GmbH & Co, Germany); powder in packets Medichronalum-Darnitsa, 7,00 g (Pharmaceutical company «Darnitsa», Ukraine); tablets of Glycin («Biotiki», Russia) and Glicised («Arterium», Ukraine), 0,10 g.

Analytical balance (ABT-120-5DM); UV-VIS spectrophotometer (Specord 200); water bath (Memmert WNB 7-45).

The aliquot part (0,1200–0,2000 g) of the glycine is put into a 25,00 ml volumetric flask, add 7,00 ml water and filled to the mark with DMF. The amount of 1,00 ml of the resulted solution is poured into a 25,00 ml volumetric flask, then treated with 2,50 ml of 1% solution of the 2,3-dichlor-1,4-naphthoquinone and mixed up. A received solution is heated up for 15 minutes on the water-bath under temperature of 95 °С, then is cooled down and filled to the mark with the DMF. Absorbance of the test solution is measured at 470 nm against the background of the compensation solution that does not contain any test solution.

Defined minimum calculated by common method is 3,20 mcg/ml.

Experimentally determined glycine optimal reaction conditions with the 2,3-dichlor-1,4-naphthoquinone as the basis for the development of spectrophotometric methods for glycine quantitative determination in the 4 drug dosage forms.

The analytical method was optimized and validated by establishing the linearity (in the range of 5,00–8,00 mg/100 ml), the correlation coefficient ($r = 1,000$), precision and the accuracy.

Thus, the peculiarity of the developed method consists in its enhanced sensitivity in comparison with other available methods of quantitative determination. The developed method is simple and useful for routine analysis of glycine in pharmaceutical formulations and in-process quality control.

Електронна адреса для листування з авторами: kate-portnaya@ukr.net