

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ**

**ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА АНАЛІТИЧНОЇ, ФІЗИЧНОЇ ТА КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ**

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Кількісне визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських
формах»**

Виконала: здобувач вищої освіти 3-го курсу, групи
118Б2Б напрямку підготовки 22«Охорона здоров'я»
Спеціальності 226 «Фармація, промислова
фармація», освітня програма «Фармація»

Кравчук Катерина Сергіївна

Керівник: кандидат педагогічних наук, доцентка

Чхало Оксана Миколаївна

Рецензент: кандидат фармацевтичних наук,
доцентка кафедри ліків та лікарської токсикології

Нароха Віолетта Петрівна

Київ – 2024

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень		4
Вступ.		5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.		8
РОЗДІЛ 1. Глутамінова кислота, методи визначення.		
1.1	Роль глутамінової кислоти в організмі.	8
1.2	Будова, фізико-хімічні властивості та отримання глутамінової кислоти.	11
1.3	Методи ідентифікації глутамінової кислоти	13
1.4	Методи кількісного визначення глутамінової кислоти	15
1.5	Застосування глутамінової кислоти	16
1.6.	Фармакодинамік	17
1.7.	Фармакокінетика.	18
1.8.	Кислотно-основне титрування (метод нейтралізації)	18
1.9.	Потенціометричне титрування	19
РОЗДІЛ 2. Експериментальна частина.		21
2.1.	Матеріали та методи.	21
2.1.1.	Мета дослідження.	21
2.1.2.	Об'єкти дослідження.	21
2.1.3.	Посуд та обладнання.	22
2.1.4.	Реактиви.	23
2.1.5.	Приготування розчинів	23
2.1.5.1.	Розчин натрій гідроксиду з молярною концентрацією еквівалента 0,1 моль/л.	23
2.1.5.2	Водний розчин індикатора бромтимолового синього.	24
2.1.5.3.	Пробопідготовка.	24
2.2.	Методика кислотно-основного титрування	24

2.3.	Методика потенціометричного титрування	25
РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення.		26
3.1.	Кількісне визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських формах методом кислотно-основного титрування.	26
3.2.	Кількісне визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських формах методом потенціометричного титрування.	28
3.3.	Часткова оцінка валідаційних характеристик.	31
3.3.1.	Оцінка специфічності методики.	31
3.3.2.	Прецизійність та робасність.	32
	Висновки.	34
	Список використаних джерел.	35
	Додатки.	37
	Summary.	42

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДФУ – державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

ГАМК– γ -аміномасляна кислота

БАД – біологічно активні добавки

ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ЕРС – електрорушійна сила

ЦНС – центральна нервова система

ТЛФ – тверда лікарська форма

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

мл – мілілітр

мг - міліграм

ВСТУП

Лікарські засоби, які містять амінокислоти, мають обширну область використання в сучасній медицині як для діагностики, лікування, так і для профілактики великої кількості захворювань. Сумарно в біологічних рідинах вміст α -амінокислот знаходиться на незмінному рівні. Якщо вміст вільних α -амінокислот змінюється в сироватці та плазмі крові або в сечі, це є ознакою порушення функції внутрішніх органів, наприклад печінки, нирок. Більшість α -амінокислот проявляють велике різноманіття біологічної активності. Наприклад, амінокислоти можуть бути джерелом енергії на клітинному рівні (глутамін, валін, лейцин). Лізин, глутамін, тирозин, аргінін є речовинами з яких синтезуються гормони, ферменти, антитіла тощо. α -Амінокислоти приймають участь в метаболізмі органічних кислот та цукрів (аланін), сприяють зниженню рівня холестерину в крові (метіонін, триптофан, лізин, аргінін), росту тканин та їх відновленню (ізолейцин, пролін, лейцин, гліцин). Деякі амінокислоти навіть сприяють виведенню важких металів з організму (метіонін, цистеїн).

Глутамінова кислота не відноситься до незамінних амінокислот, але для синтезу великої кількості фізіологічно активних речовин, що є необхідними для підтримки життєдіяльності організму, вона є основою. Глутамінова кислота може здатна слугувати захисним фактором при різних отруєннях печінки і нирок, підтримувати постійну реакцію середовища, посилювати фармакологічну дію одних лікарських засобів та послаблювати токсичність інших [2]. Саме ці властивості є підґрунтям до застосування глутамінової кислоти для лікування великої кількості захворювань. В медичній практиці глутамінову кислоту застосовують при лікуванні епілепсії (в основному малих нападів), соматогенних, інволюційних, інтоксикаційних психозів, реактивних станів з явищами депресії, виснаження; при затримці психічного розвитку у дітей, хворобі Дауна, при дитячих церебральних паралічах, поліомієліті, при прогресуючій міопатії, для усунення і попередження нейротоксичних явищ, що

можуть виникнути при застосуванні ізоніазиду та інших препаратів групи гідразиду ізонікотинової кислоти [1].

Актуальність: Пошук нових методик кількісного визначення глютамінової кислоти в твердих лікарських формах.

Мета: розробити методику кількісного визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських формах Глутамінова кислота (виробник Київський вітамінний завод, Україна) та Glutamic acid (Swanson, США).

Завдання:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо застосування глютамінової кислоти, її фармакологічні властивості, фізико-хімічні властивості та механізм дії.

2. Проаналізувати відомі методики кількісного визначення глютамінової кислоти. Розробити методику кількісного визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських формах Глутамінова кислота (Київський вітамінний завод) та Glutamic acid (Swanson, США) методом потенціометричного титрування.

3. Провести валідацію методики кількісного визначення глютамінової кислоти методом потенціометричного титрування.

Предмет дослідження: Метод кислотно-основного та потенціометричного титрування для кількісного визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських формах.

Новизна та значення одержаних результатів: результатом роботи є нова сучасна альтернативна методика кількісного визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських формах.

Апробація результатів дослідження. Результати роботи були представлені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету, 19-20.12.2023 (Додаток 5).

Структура роботи. Робота включає Таблиць -5, Рисунків – 3, Додатків – 5, загальний обсяг 43 сторінок.

ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Глутамінова кислота, методи визначення.

1.1. Роль глутамінової кислоти в організмі.

Глутамінова кислота була відкрита в 1866 році німецьким хіміком Карлом Генріхом Рітхаузенем. Він кий обробив клейковину пшениці сульфатною кислотою. Звідси і пішла назва глутамінової кислоти. Пізніше, на початку ХХ століття уже японський дослідник Кікунае Ікеда зміг ідентифікувати кристали коричневого кольору, що утворились після випаровування бульйону комбу, як глутамінову кислоту. Після того, як він спробував на смак ці кристали, вони здались йому дуже смачними і мали смак дуже знайомий, який він уже відчував в багатьох продуктах харчування, особливо в морських водоростях. Цей смак Ікеда назвав умамі. Пізніше він запатентував метод виробництва кристалічної солі глутамінової кислоти, глутамату натрію [4].

Глутамінова кислота ((S)-2-амінопентан-1,5-дикарбонова кислота) – аліфатична дикарбонова кислота – є в організмі в достатньо великій кількості (до 25%) в складі білків та інших речовин, а також в вільному (незв'язаному) стані. Вона складає приблизно четверту частину від об'єму всіх (замінних і незамінних) амінокислот в організмі та виконує дуже важливі функції [5].

Хоча глутамінову кислоту вважають замінною амінокислотою, дослідження минулих років показали, що для деяких органів людини вона є незамінною і її не можна замінити на жодну іншу амінокислоту.

Основні функції глутамінової кислоти в організмі:

- утворення інших амінокислот (γ -аміномасляної кислоти, гістидину, орнітину і проліну і т.д.);
- бере участь в синтезі вуглеводів, нуклеїнових кислот, ферментів;
- бере участь у синтезі серотоніну (через триптофан);

- знешкоджує амоніак, утворений при розпаді амінокислот, білків, амінопуринів (утворюється глютамін); [6]
- бере участь у ліпідному обміні;
 - має анаболітичну дію;
 - бере участь в мінеральному обміні –підвищує проникливість м'язових тканин до іонів калію;
 - має нейромедіаторну функцію.

В головному мозку важливе глютамінова кислота перетворюється в γ -аміномасляну кислоту (ГАМК). Вона бере участь в цілому ряді реакцій та взаємодіє з продуктами циклу трикарбонових кислот. Глутамінова кислота є попередником γ -аміномасляної кислоти [4]. Наразі відомо, що ГАМК бере участь у багатьох обмінних процесах мозкової тканини. Вона впливає на транспорт та утилізацію глюкози, дихання та окисне фосфорилування, метаболізм основних джерел енергії, бере участь у регуляції осмотичних процесів, має антигіпоксичну дію.

Біосинтез вуглеводів з глютамінової кислоти дуже важливий як резервний механізм постачання глюкози до мозку при нестачі вуглеводів у харчуванні або при посилених фізичних навантаженнях. Глутамінова кислота не лише здатна сама перетворюватись на глюкозу, але і прискорює утворення глюкози (глюконеогенез) з інших речовин у печінці та нирках, завдяки чому її називають глюконеогенною амінокислотою.

Глутамінова кислота здатна перетворюватись в незамінну амінокислоту триптофан, з якої синтезується серотонин, що є одним із гальмівних нейромедіаторів центральної нервової системи та виконує анаболітичну функцію.

Утворена в організмі глютамінова кислота розпадається в організмі одним із наступних способів [13]. Це або трансамінування – (при цьому утворюється α -кетоглутарат і аспартат, або окисне дезамінування (під дією

глутаматдегідрогенази розкладається в печінці з виділенням амоніаку, який потрапляє в цикл сечовин, або декарбоксілювання (ферментом глутамат-декарбоксілазою з утворенням ГАМК).

Джерелами глутамінової кислоти є соя, м'ясо, птиця, риба, яйця і молочні та кисломолочні продукти. Багато її і в рослинній їжі: зеленому горошку, буряку, кукурудзі, моркві, цибулі, шпинаті і ін [14].

Натрієва сіль глутамінової кислоти має смак м'яса і в багатьох країнах виробляється і використовується як приправа. З року в рік зростає використання натрію глутамату для надання виробам м'ясного смаку [4].

Глутамінову кислоту часто використовують при виробництві спортивного харчування та дієтичних добавок (ДД).

В медицині застосовують її при порушенні роботи нервової системи (лікування розумової відсталості, епілепсії, після травм мозку, після перенесених крововиливів або при запальних захворюваннях головного мозку, лікування м'язової дистрофії, хвороби Паркінсона). Також глутамінова кислота знижує процеси перекисного окислення ліпідів і підвищує ефективність лікування хворих на бронхіальну астму, особливо в поєднанні з глюкокортикоїдами [14].

Глутамін застосовують при депресії, безсонні, дратівливості, хворобі Крона. У недоношених немовлят або дітей з низькою вагою при народженні глутамін використовується для зниження захворюваності і смертності [7].

Глутамінова кислота утворюється у здоровому організмі в достатній кількості, але, коли з'являються різні хвороби та із збільшенням віку людини, її рівень може зменшуватись. Тому, в таких випадках потрібно додатково приймати глутамінову кислоту. Або додавати у раціон продукти, які містять багато глутамінової кислоти, або приймати у вигляді дієтичних добавок [8].

1.2. Будова, фізико-хімічні властивості та отримання глютамінової кислоти.

Глутамінова кислота - (S)-2-амінопентан-1,5-дикарбонова кислота (рис.1) – безбарвний кристалічний порошок або кристалічний порошок білого кольору, який легко розчиняється у киплячій воді, але погано розчиняється у холодній воді. Майже не розчиняється в ацетатній кислоті, етері, етиловому спирті, ацетоні.

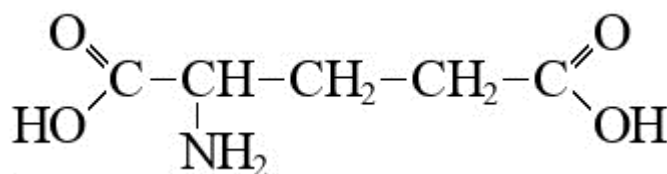


Рис.1. Глутамінова кислота

Молекулярна формула – $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$

Молярна маса – 147,13 г/моль

Температура плавлення - 160°C

Температура кипіння - 205°C

Густина – 1,4601 г/л (20°C) [2].

Глутамінова кислота - це типова аліфатична α -амінокислота. Вона взаємодіє з купрум сульфатом, утворюючи при цьому стійку темно-синю комплексну сполуку. При нагріванні вона перетворюється на піроглутамінову (2-пірролідон-5-карбонову) кислоту. В утворенні пептидних зв'язків бере участь α -карбоксильна група, деколи – γ -аміногрупа [2].

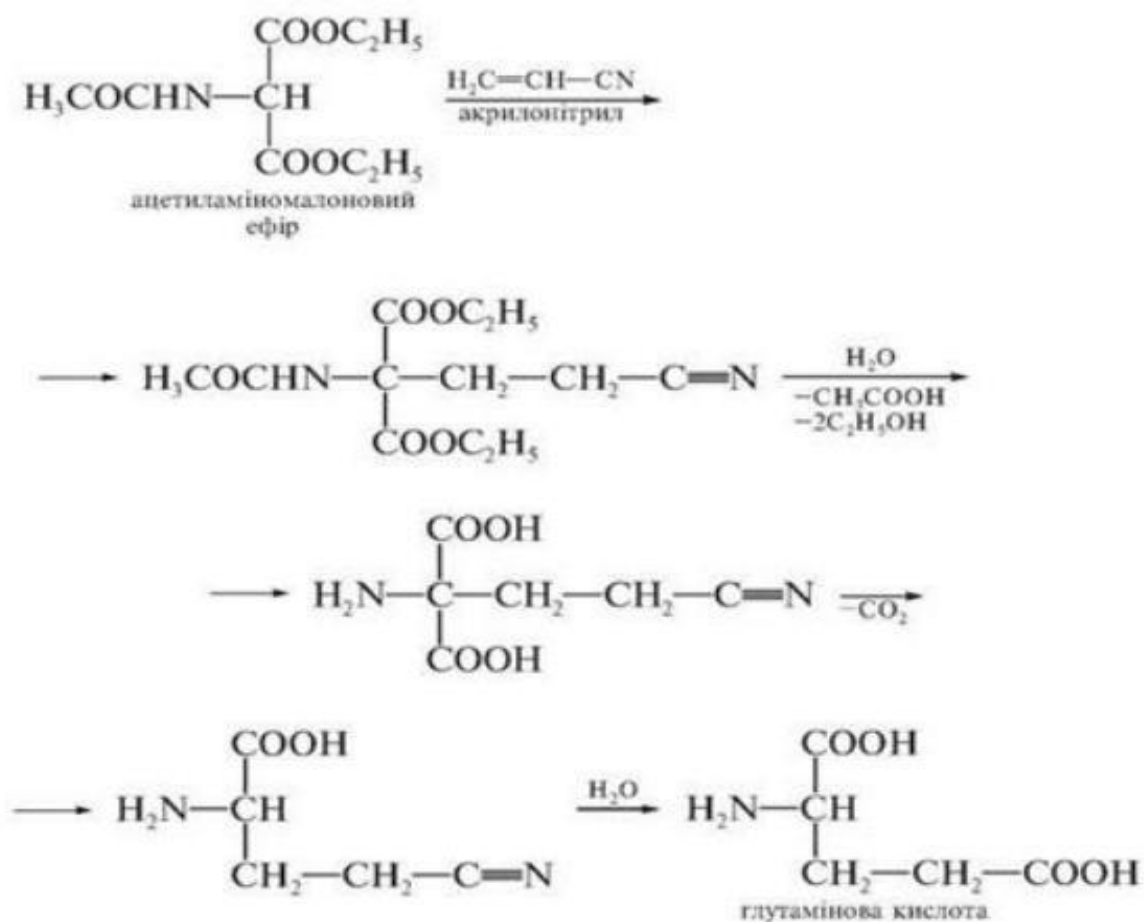
Може також відбуватися декарбоксилювання за місцем карбоксильної групи (фермент глютаматдекарбоксилаза). В результаті цього процесу утворюється γ -аміномасляна кислота. Характерні для глютамінової кислоти також реакції дезамінування та переамінування, в результаті яких утворюється

бурштинова та α -кетоглутарова кислоти, які відіграють важливу роль в обміні протеїногенних амінокислот, а також у забезпеченні реакцій циклу трикарбонних кислот [9].

Глутамінова кислота входить до складу багатьох білкових речовин: міозину, казеїну, α -лактоглобуліну і т.д. У доволі великій кількості вона знаходиться у білках мозку, злаках [10].

Методи отримання глутамінової кислоти.

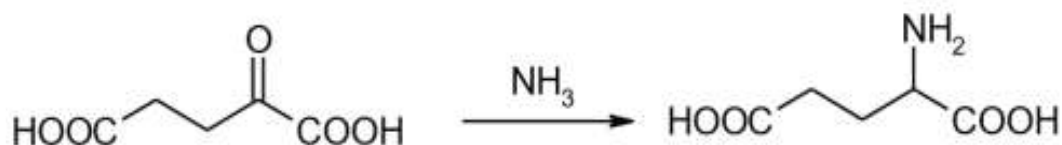
Глутамінову кислоту можна отримати гідролізом білків, а також за допомогою синтезу – хімічного, ферментативного, мікробіологічного. Її можна отримати з акрилонітрилу й ацетиламінмалонового естеру [2]:



На сьогодні найбільші можливості в отриманні глутамінової кислоти має мікробіологічний синтез. Його найчастіше застосовують у промисловості

використовуючи такі бактеріальні культури: *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium* (паличкоподібні, грам позитивні, нерухомі бактерії). Глутамінову кислоту, крім вуглеводів (глюкоз, наприклад), можна добувати також з вуглеводнів природного газу (метан, етан), ароматичних сполук (бензиловий спирт, пірокатехін та ін.), парафіну. Можуть використовуватись також газойль, оцтова, аміномасляна, фумарова кислоти та інші речовини [11].

Наразі промисловий метод одержання глутамінової кислоти відбувається мікробіологічним синтезом з α -кетоглутарової кислоти за схемою [2]:



При отриманні глутамінової кислоти за допомогою гідролізу білків використовують білки тваринного та рослинного походження. Наприклад, можна використати для цього клейковину пшениці, молоко, відходи від м'ясокомбінатів, відходи цукрових комбінатів, спиртових заводів. Глутамінову кислоту можна отримати також при переробці м'яса, при якій добувають цукрові сиропи, а також бетаїн, холін та інші.

Синтезувати глутамінову кислоту можна також ферментативним способом з α -кетоглутарової кислоти. Для цього використовують ферменти транс амілази або глутаматдегідрогенази. Використовують при цьому мікроорганізми, які можуть утворювати α -кетоглутарову кислоту з іншої сировини, наприклад *Pseudomonas*, *Esherichia*, *Kluyverd citrophila* [2].

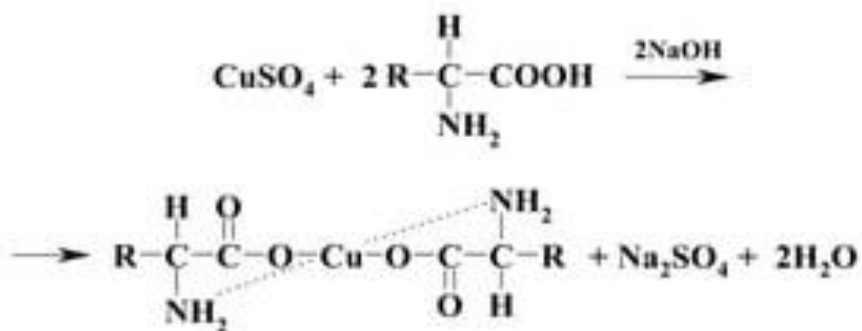
1.3. Методи ідентифікації глутамінової кислоти

Згідно з ДФУ [12] глутамінову кислоту ідентифікують за значенням питомого обертання; за ІЧ-спектром досліджуваної субстанції, який має

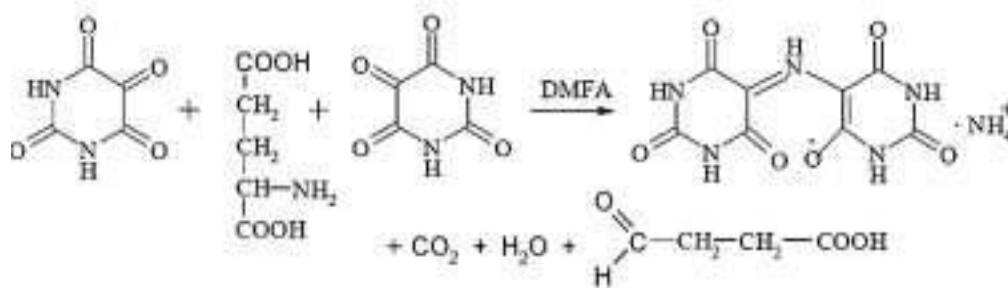
відповідати спектру фармакопейного стандартного зразка (ФСЗ); методом тонкошарової хроматографії (ТШХ), використовуючи реакцію з нінгідрином та ТШХ пластинки з шаром силікагелю. Ще один фармакопейний метод ідентифікації глютамінової кислоти – реакція з натрію гідроксидом при додаванні розчину фенолфталеїну та формальдегіду, де загальний об'єм розчину гідроксиду, що витратився на реакцію, має бути 4,0 – 4,7 мл.

До нефармакопейних методів ідентифікації глютамінової кислоти відноситься кольорова реакція з резорцином у присутності концентрованої сульфатної кислоти. При дії концентрованої H_2SO_4 на глютамінову кислоту відбувається внутрішньомолекулярна реакція дегідратації та утворюється піролідонкарбонова кислота, яка конденсується з резорцином з утворенням сплаву червоного кольору, який розкладається в розчині амоніаку і стає червоно-фіолетовим з зеленою флуорисценцією [10].

Ще одна реакція, яка не відноситься до фармакопейних – реакція з купрум сульфатом у лужному середовищі, в результаті якої утворюється комплексна сполука темно-синього кольору [10].

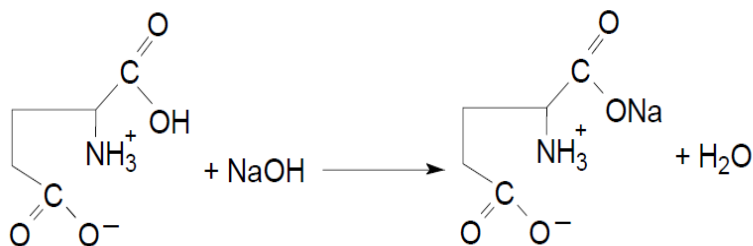


Можна використати спектрофотометричний метод ідентифікації, який ґрунтується на взаємодії глютамінової кислоти з алоксаном у середовищі вода-диметилформамід [2]:

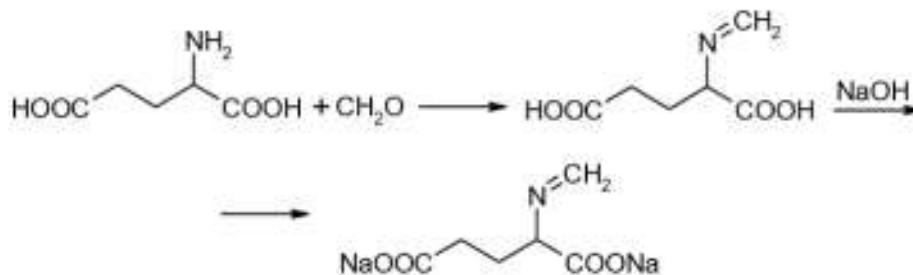


1.4. Методи кількісного визначення глутамінової кислоти

1. Згідно з ДФУ [12] та згідно з Європейською фармакопеєю (Ph.Eur.) (Додаток 1.) глутамінову кислоту визначають методом кислотно-основного титрування розчином натрію гідроксиду, використовуючи в якості індикатора розчин бромтимолового синього (інтервал переходу 6,0 – 7,6). Титрування проводять до переходу забарвлення від жовтого до блакитного [10].



2. Метод нейтралізації, формольне титрування (метод Серенсена). Спочатку додають розчин формальдегіду, який нейтралізований за фенолфталеїном. При цьому утворюється азометин (N-метиліденова похідна), який титрують розчином лугу [2]



3. Визначення органічно зв'язаного нітрогену - метод К'ельдаля.

Ця методика складається з декількох етапів. Спочатку розкладають глютамінову кислоту при нагріванні з концентрованою сульфатною кислотою до NH_4HSO_4 , використовуючи колбу К'ельдаля, пароутворювач. Потім розкладають амоній гідросульфат натрій гідроксидом до амоніаку і відганяють його у колбу-приймач, де він взаємодіє з борною кислотою, утворюючи амоній тетрагідроксоборат. І на останньому етапі титрують амоній тетрагідроксоборат розчином хлоридної кислоти.

4. Реакція глютамінової кислоти з купрум сульфатом використовується для куприметричного титрування. Іони гідрогену, які при цьому виділяються, нейтралізують фосфатним або боратним буферним розчином. Надлишок іонів купруму видаляють у вигляді осаду поганорозчинної солі або гідроксиду. Визначають кількість купруму в утвореному комплексі з амінокислотою.

5. Фотоколориметричне визначення глютамінової кислоти. Використовується кольорова реакція з алоксаном. Спочатку отримують забарвлені стандартні розчини перевівши їх у амонієві солі пурпурової кислоти та будують калібрувальний графік залежності інтенсивності поглинання забарвлених розчинів від їх концентрації. Проводять вимірювання оптичної густини досліджуваного розчину та за калібрувальним графіком визначають його концентрацію [2].

1.5. Застосування глютамінової кислоти

Лікарські засоби, які у своєму складі містять глютамінову кислоту, застосовують для лікування захворювань центральної нервової системи (ЦНС) таких як синдром Дауна, затримка психічного розвитку у дітей, ДЦП, епілепсія, шизофренія, психози, наслідки енцефаліту і менінгіту, безсоння та інші.

Враховуючи вплив препаратів з глутаміновою кислотою на нервову систему, вони не призначаються при вагітності або годуванні груддю, а також слід з великою обережністю застосовувати їх при керуванні транспортом або при роботі з іншими механізмами [1].

Також відомі і інші протипоказання до застосування глутамінової кислоти. До них відносяться психотичні реакції, виразкова хвороба шлунка, підвищена збудливість, ниркова недостатність, нефротичний синдром, виразка дванадцятипалої кишки, захворювання органів кровотворення, анемія. Потрібно полоскати ротову порожнину слабким розчином харчової соди (натрій гідрокарбонату) після прийому препарату, що містить глутамінову кислоту, та регулярно проводити дослідження сечі та крові пацієнтам, які приймають глутамінову кислоту. Препарати, у складі яких є глутамінова кислота, є у вільному продажу в аптечних мережах, а також на різноманітних сайтах мережі Інтернет [15].

Перелік препаратів, до складу яких входить глутамінова кислота:

- Глутамінова кислота,
- Аміноплазмаль,
- Глутамевіт,
- Кабівен периферичний,
- Кабівен центральний,
- Нутрифлекс
- Церебrolізат,
- Елтацин,
- Glutamic acid тощо.

1.6. Фармакодинаміка.

Глутамінова кислота – це амінна амінокислота, яка бере участь у білковому обміні, а також у вуглеводному обміні. Вона стимулює окиснювальні процеси, а

також допомагає знешкодити та вивести з організму амоніак. Вона бере участь у переамінуванні амінокислот в організмі, сприяє синтезу ацетилхоліну та аденозинтрифосфату (АТФ). Також глутамінова кислота допомагає організму бути стійкішим до гіпоксії, слугує перенесенню іонів калію, грає велику роль у діяльності скелетних м'язів. Глутамінова кислота стимулює передачу збудження у синапсах центральної нервової системи оскільки відноситься до нейромедіаторних амінокислот [1].

1.7. Фармакокінетика.

Глутамінова кислота, коли її приймати внутрішньо, добре всмоктується та швидко елімінується з крові. Накопичується вона здебільшого у м'язах та нервовій тканині, нирках, печінці. Вона здатна проникати через мембрани клітин. Певною мірою глутамінова кислота переамінується під час всмоктування, при цьому утворюється аланін. Під дією глутамдекарбоксілази у мозку вона перетворюється на гамма-аміномасляну кислоту, яка є медіатором. Приблизно 4 - 7 % глутамінової кислоти у незміненому вигляді виводиться з сечею, а 93 – 96 % – використовується при метаболічних перетвореннях [1].

1.8. Кислотно-основне титрування (метод нейтралізації)

Кислотно-основне титрування (метод нейтралізації) - кількісний об'ємний метод аналізу, в якому для титрування використовують титранти (робочі розчини) сильних кислот або сильних основ. При титруванні до розчину аналізованої речовини (аналіту) додають титрант (робочий розчин) доти, доки не буде досягнута точка еквівалентності (коли кількості визначуваної речовини і титранта будуть еквівалентними) [16].

Методи кислотно-основного титрування поділяють на дві групи:

а) алкаліметрія — використовують титрант сильної основи (лугу), наприклад NaOH, KOH, Ba(OH)₂ та ін.;

б) ацидиметрія — використовують титрант сильної кислоти, наприклад хлоридної кислоти, сульфатної кислоти, перхлоратної кислоти (HClO_4) та ін [3].

Методами кислотно-основного титрування кількісно визначають кислоти, основи, а також деякі солі.

В методах нейтралізації для визначення кінця титрування використовують кислотно-основні індикатори. Колір індикатора залежить від концентрації у розчині іонів гідрогену. За сучасною теорією індикатори методу нейтралізації є слабкими органічними кислотами або основами, молекулярна форма яких має інше забарвлення, ніж іонна форма [17].

1.9. Потенціометричне титрування

У потенціометричному титруванні кінцеву точку титрування визначають за допомогою вимірювання електрорушійної сили (ЕРС) гальванічного елемента, який складається з індикаторного електрода та електрода порівняння [3]. При цьому вибирають такий індикаторний електрод, для якого його потенціал залежить від концентрації визначуваної речовини або від концентрації титранта чи продукту реакції. Для електрода порівняння потенціал під час титрування повинен залишатися постійним.

Електроди встановлюють зазвичай безпосередньо в аналізованій розчин. Під час потенціометричного титрування до аналізованого розчину додають титрант невеликими порціями, після чого щоразу вимірюють ЕРС. Поблизу точки еквівалентності титрант додають краплями, продовжуючи вимірювати ЕРС після додавання кожної порції титранта. ЕРС залежить від потенціалу індикаторного електрода і біля точки еквівалентності різко змінюється [3, 16].

За отриманими даними будують криву потенціометричного титрування, з якої визначають об'єм титранта в точці еквівалентності.

Крива потенціометричного титрування — це залежність потенціалу індикаторного електрода від об'єму доданого титранта. Криві потенціометричного титрування будують у різних координатах:

– криві титрування в координатах $E - V(T)$ (їх деколи називають інтегральними кривими титрування);

– диференціальні криві титрування будують у координатах

$$\frac{dE}{dV} - V(T) \text{ і } \frac{d^2E}{dV^2} - V(T);$$

– криві титрування за методом Грана — у координатах $\frac{\Delta V}{\Delta E} - V(T)$, де, $V(T)$ — об'єм доданого титранта, ΔE зміна потенціалу індикаторного електрода, що відповідає порції ΔV титранта [3].

Метод потенціометричного титрування можна застосовувати для визначення точки еквівалентності (кінцевої точки титрування) у всіх титриметричних методах. Для кожного методу – свій індикаторний електрод.

Наприклад, індикаторними електродами можуть бути: платиновий електрод для методів оксидиметрії, скляний електрод – для кислотно-основного титрування, іоноселективні електроди – для комплексонометрії і т.д.

Метод потенціометричного титрування має достатньо високу точність та дозволяє проводити аналіз в мутних та кольорових розчинах. Ним можна визначити декілька компонентів в багатокомпонентному аналізованому розчині, наприклад. Методами потенціометричного титрування аналізують багато лікарських речовин і він часто зустрічається в статтях ДФУ [3].

Розділ 2. Експериментальна частина.

Практична частина роботи була виконана на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії НМУ імені О.О. Богомольця.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження. Метою роботи є розробка методики кількісного визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських формах методом потенціометричного титрування.

2.1.2. Об'єкти дослідження.

Для розробки методики було обрано тверді лікарські форми Glutamic acid (Зразок 1, виробник Swanson, США) та Глутамінова кислота (Зразок 2., виробник АТ «Київський вітамінний завод», Київ, Україна).



Зразок 1.



Зразок 2.

Тверді лікарські форми реалізуються аптеками у вигляді таблеток або капсул та мають склад:

Зразок 1.

Діюча речовина глутамінова кислота, 1 капсула містить 500 мг глутамінової кислоти.

Допоміжні речовини: гіпромелоза, мікрокристалічна целюлоза, L- лейцин, діоксид кремнію.

Зразок 2.

Діюча речовина глутамінова кислота, 1 таблетка, вкрита оболонкою, містить 250 мг глутамінової кислоти.

Допоміжні речовини: целюлоза мікрокристалічна, повідон, кальцію стеарат;

Оболонка: суміш для плівкового покриття Opadry II Blue: гіпромелоза, лактози моногідрат, поліетиленгліколь, титану діоксид (E171), індигокармін (E132), хіноліновий жовтий (E104) [1].

2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Мірний посуд класу точності А (Додаток 2.).
2. Склянки хімічні, місткістю 100 мл.

3. Ваги лабораторні аналітичні з похибкою вимірювання 0,0002 г Radwag® AS220.R2, заводський №502964, інвентарний №104769236, свідоцтво про калібрування № 3816 від 30.05.2019 р.
4. Електрична плитка.
5. рН-метр рН-150 МІ (Додаток 3.).
6. Електрохімічна комірка зі скляним та хлорсрібним електродами.
7. Магнітна мішалка.

2.1.4. Реактиви.

1. Фармакопейний стандартний зразок ДФУ Глутамінова кислота, каталожний номер G0181, реєстраційний номер 56-86-0.
2. Дистильована вода.
3. Натрій гідроксид хімічно чистий (х.ч.).
4. Бромтимоловий синій чистий для аналізу (ч.д.а).
5. NaOH.
6. Калібрувальні буферні розчини з рН 9.18, 6.86, 4.01, 1.65.

2.1.5. Приготування розчинів

Кількісний склад глютамінової кислоти в фармацевтичних препаратах визначали методом потенціометричного титрування та, для порівняння, методом кислотно-основного титрування.

2.1.5.1. Розчин натрій гідроксиду з молярною концентрацією еквівалента 0,1 моль/л.

2 г NaOH переносять в мірну колбу об'ємом 500 мл, додають невелику кількість дистильованої води, перемішують до повного розчинення лугу та доводять об'єм розчину до мітки колби дистильованою водою. Старанно перемішують. Або готують розчин з фіксаналу.

2.1.5.2. Водний розчин індикатора бромтимолового синього.

Наважку 0,02 г бромтимолового синього переносять в мірну колбу об'ємом 50 мл, додають 0,3 мл розчину NaOH з молярною концентрацією 0,1 моль/л, доводять об'єм розчину до мітки колби охолодженою свіжопрокип'яченою водою.

2.1.5.3. Пробопідготовка.

Вміст відкритої капсули зразка 1 або розтерту таблетку зразка 2 поміщають у мірну колбу ємністю 50 мл, додають свіжопрокип'яченої води та гріють на водяній бані протягом 25 хв. при температурі 60 °С (оптимальну температуру підібрали після декількох експериментів), доводять об'єм розчину до мітки колби дистильованою водою. Розчин охолоджують до кімнатної температури. Якщо необхідно, то розчин фільтрують один або декілька разів.

2.2. Методика кислотно-основного титрування

Після пробопідготовки відбирають мірною піпеткою 5 мл приготовленого аналізованого розчину, додають 15 мл дистильованої води, 5 крапель розчину індикатора бромтимолового синього. Титрують робочим розчином NaOH з молярною концентрацією 0,1 моль/л до зміни забарвлення з жовтого до блакитно-зеленого [12].

Вміст глютамінової кислоти в препараті (m) обчислюють за такою формулою

$$m = \frac{(C_n \cdot V_{т.е.})_{\text{NaOH}} \cdot M_e(\text{г.к.})}{1000} \cdot \frac{V_k}{V_a}, \text{г}$$

Де C_n – молярна концентрація еквівалента розчину NaOH (нормальність), моль/л;

$V_{т.е.}$ – об'єм титранта в точці еквівалентності, мл;

M_e (г.к.) – молярна маса еквівалента глютамінової кислоти, г/моль;

V_k – об'єм колби, мл;

V_a – об'єм аліквоти, мл.

2.3. Методика потенціометричного титрування

Увімкнення та налаштування приладу проводять відповідно до інструкції до приладу.

Перед проведенням аналізу обов'язково проводять калібрування електродів за допомогою буферних розчинів за відомою методикою.

Після пробопідготовки 5 мл аналізованого розчину переносять у склянку, додають невелику кількість води таким чином, щоб електроди були занурені в розчин на 1.5-2 см. При постійному перемішуванні розчину (за допомогою магнітної мішалки) вимірюють початкову величину рН. Далі додають з бюретки порціями робочий розчин NaOH та вимірюють рН після додавання кожної доданої порції розчину лугу. Таким чином титрують, додаючи розчин титранту порціями по 0,5 мл.

По різкій зміні рН визначають стрибок титрування, який відповідає області точки еквівалентності. Потім виконують титрування з новою аліквотною частиною досліджуваного розчину за тих же умов, при цьому поблизу ділянки стрибка рН робочий розчин додають порціями по 0,1 мл. Титрування закінчують тоді, коли рН майже перестане змінюватись (4-5 точок).

За отриманими експериментальними даними будують криву титрування – графік залежності рН розчину від об'єму титранта NaOH. Визначення об'єму у точці еквівалентності проводять за методом Грана [3].

Вміст глютамінової кислоти у досліджуваному розчині розраховують за формулою, наведеною в п. 2.1.6.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

3.1. Кількісне визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських формах методом кислотно-основного титрування.

Визначення вмісту глютамінової кислоти у твердих лікарських формах проводили, використовуючи метод кислотно-основного титрування, методика якого описана у п. 2.1.6.

Даним методом були відтитровані розчини Зразків 1 та 2. Процес титрування повторили 5 разів. Масу глютамінової кислоти розраховували за формулою, представленою в п. 2.1.6. Результати титрування наведені у таблиці 1.

Таблиця 1. Результати кислотно-основного титрування розчинів Зразку 1 та Зразку 2.

№	Концентрація глютамінової кислоти, мг враховуючи розведення	
	Зразок 1	Зразок 2
1	425,78	223,56
2	429,44	225,68
3	422,36	225,87
4	430,54	224,14
5	429,84	225,03
Середнє значення	427,59	224,86

Згідно з інструкцією до застосування Зразок 1 містить 500 мг глютамінової кислоти, Зразок 2 – 250 мг.

За результатами визначень розраховано наступні метрологічні характеристики:

– відносне стандартне відхилення у відсотках RSD:

$$RSD \text{ (зразок 1)} = 0,81\%$$

$$RSD \text{ (зразок 2)} = 0,44\%$$

- дисперсія:

$$s^2 \text{ (зразок 1)} = 11,95$$

$$s^2 \text{ (зразок 2)} = 0,98$$

- довірчий інтервал та оцінка правильності результатів:

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 427,59 \pm 4,29 \text{ (зразок 1)}$$

Оскільки довірчий інтервал знаходиться в межах від 423,30 до 431,88, а вміст глютамінової кислоти згідно з інструкцією для медичного застосування 500 мг, то отримані результати не можна вважати правильними, даний метод містить систематичну похибку. Результати занижені.

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 224,86 \pm 1,23 \text{ (зразок 2)}$$

Довірчий інтервал знаходиться в межах від 223,63 до 226,09, а вміст глютамінової кислоти згідно з інструкцією для медичного застосування 250 мг, отже отримані результати не можна вважати правильними і використаний метод містить систематичну похибку. Результати також занижені.

- відносна похибка середнього значення:

$$\bar{\varepsilon} \text{ (зразок 1)} = 1,00\%$$

$$\bar{\varepsilon} \text{ (зразок 2)} = 0,55\%$$

3.2. Кількісне визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських формах методом потенціометричного титрування.

Визначення вмісту глютамінової кислоти у твердих лікарських формах проводили, використовуючи метод кислотно-основного титрування, методика якого описана у п. 2.1.7.

Даним методом були відтитровані розчини Зразків 1 та 2. Процес титрування повторили 5 разів.

За результатами титрування були побудовані криві потенціометричного титрування, які наведені на рисунках 2 та 3.

Після чого методом Грана було розраховано об'єм титранта, який пішов на титрування у точці еквівалентності кожної кривої. Масу глютамінової кислоти розраховували за формулою, представленою в п. 2.1.6.

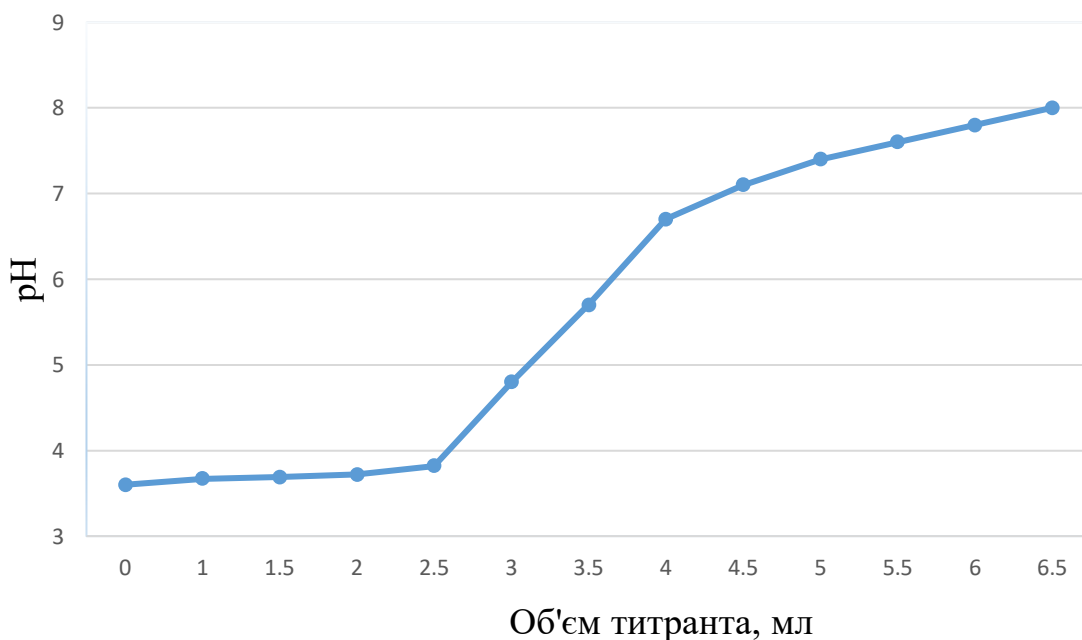


Рис. 2. – Крива потенціометричного титрування розчину Зразка 1.

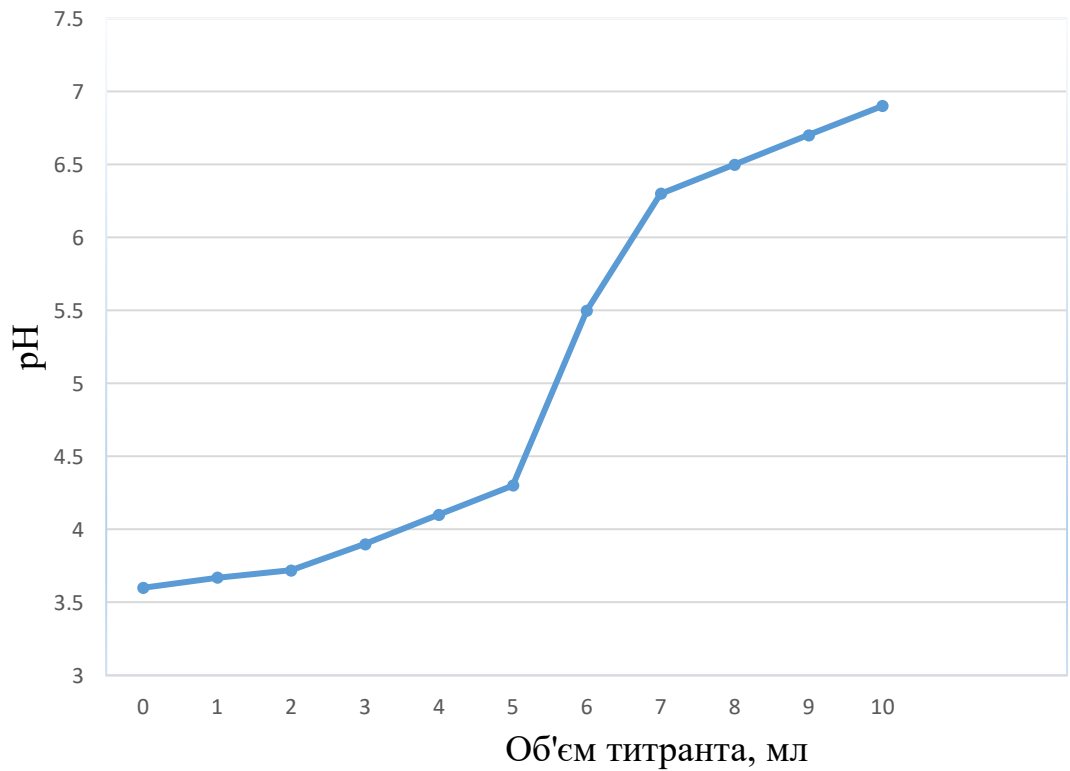


Рис. 3. - Крива потенціометричного титрування розчину Зразка 2

Таблиця 2. Результати потенціометричного титрування розчинів Зразку 1 та Зразку 2.

№	Концентрація глютамінової кислоти, мг враховуючи розведення	
	Зразок 1	Зразок 2
1	498,79	247,66
2	487,43	240,58
3	494,80	248,77
4	490,52	248,26
5	498,84	238,05
Середнє значення	494,08	244,66

За результатами визначень розраховано наступні метрологічні характеристики:

– відносне стандартне відхилення у відсотках RSD:

$$RSD \text{ (зразок 1)} = 1,00\%$$

$$RSD \text{ (зразок 2)} = 2,00\%$$

- дисперсія:

$$s^2 \text{ (зразок 1)} = 25,564$$

$$s^2 \text{ (зразок 2)} = 24,798$$

- довірчий інтервал та оцінка правильності результатів:

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 494,08 \pm 6,28 \text{ (зразок 1)}$$

Отже, довірчий інтервал перебуває в межах від 487,80 до 500,36, куди входить значення вмісту глютамінової кислоти згідно з інструкцією для медичного застосування 500 мг. Значить, отримані результати можна вважати правильними, даний метод не містить систематичної похибки.

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 244,66 \pm 6,18 \text{ (зразок 2)}$$

Довірчий інтервал для зразку 2 перебуває в межах від 238,48 до 250,84, куди входить значення вмісту глютамінової кислоти згідно з інструкцією для медичного застосування 250 мг. Отже, отримані результати можна вважати правильними, використаний метод не містить систематичної похибки.

- відносна похибка середнього значення:

$$\bar{\varepsilon} \text{ (зразок 1)} = 1,27\%$$

$$\bar{\varepsilon} \text{ (зразок 2)} = 2,53\%$$

Таблиця 3. – Дані порівняльного визначення глютамінової кислоти у Зразках 1 та 2 методами кислотно-основного та потенціометричного титрування.

Об'єкт	Вміст відповідно до інструкції до застосування, мг	Знайдено, мг	
		Кислотно-основне титрування	Потенціометричне титрування
Зразок 1	500,00	427,59	470,39
Зразок 1	250,00	224,86	237,75

Отже, потенціометричне титрування забезпечує отримання правильних результатів, а кислотно-основне титрування – дають занижені результати.

3.3. Часткова оцінка валідаційних характеристик.

Щоб впевнитись, що результати, отримані при дослідженні, точні та надійні потрібно провести часткову валідацію розробленої методики кількісного визначення глютамінової кислоти у твердих лікарських формах [19, 20].

3.3.1. Оцінка специфічності методики.

Враховуючи те, що методика кількісного визначення глютамінової кислоти була апробована на твердих лікарських формах, які, окрім глютамінової кислоти, містять також допоміжні речовини і отримані результати дослідження її вмісту

відповідають наведеному в інструкції до медичного застосування, дана методика може вважатись специфічною.

3.3.2. Прецизійність та робасність.

Прецизійність визначалась для серії вимірювань на різних пробах одного і того ж зразка. Вона характеризує близькість або, навпаки, розбіжність отриманих результатів даної методики і обумовлюється випадковими помилками [18]. Ми оцінювали прецизійність для методики кількісного визначення глютамінової кислоти методом потенціометричного титрування на рівні збіжності. Для оцінки готували три розчини з трьох наважок і для кожного з цих розчинів проводили по три визначення методом потенціометричного титрування та визначали вміст глютамінової кислоти в зразках.

Коли визначали оптимальні умови для проведення кількісного визначення глютамінової кислоти методом потенціометричного титрування, оцінювали і робасність методики проводячи дослідження зразків у різні дні. Результати Отриманих даних наведені в Таблицях 4 та 5.

Таблиця 4. Результати кількісного визначення глютамінової кислоти методом потенціометричного титрування у Зразку 1.

	День 1	День 2
	Вміст глютамінової кислоти, мг	
1	471,79	470,68
2	469,43	472,51
3	470,80	469,17
4	470,52	471,63
5	469,84	471,34
Середнє значення	470,48	471,07
Об'єднане середнє	470,77	
Відносне стандартне відхилення (%)	0,228	
Коефіцієнт Стьюдента (95%, 9)	2,2622	

Відносний довірчий інтервал (%)	0,52
Критичне значення для збіжності результатів	0,52% < 2%

Таблиця 5. Результати кількісного визначення глютамінової кислоти методом потенціометричного титрування у Зразку 2.

	День 1	День 2
	Вміст глютамінової кислоти, мг	
1	237,66	236,32
2	237,58	236,78
3	236,77	235,47
4	238,26	237,21
5	238,05	236,11
Середнє значення	237,66	236,38
Об'єднане середнє	237,02	
Відносне стандартне відхилення (%)	0,377	
Коефіцієнт Стьюдента (95%, 9)	2,2622	
Відносний довірчий інтервал (%)	0,85	
Критичне значення для збіжності результатів	0,85% < 2%	

Таким чином підтверджується внутрішньолабораторна точність запропонованої методики, оскільки величина відносного довірчого інтервалу відповідає критерію прийнятності (не перевищує максимальну припустиму невизначеність аналізу (2,0%).

ВИСНОВКИ

За підсумками виконаної роботи було отримано такі результати:

- Проаналізовано літературні дані щодо хімічних властивостей глутамінової кислоти, її фармакологічної дії та ролі для організму людини.
- На основі проведених досліджень була запропонована та апробована методика кількісного визначення глутамінової кислоти у твердих лікарських формах Глутамінова кислота (Київський вітамінний завод) та Glutamic acid (Swanson, США) методом потенціометричного титрування.
- Частково оцінені валідаційні характеристики розробленої методики за специфічністю та прецизійністю та робастністю, які відповідають критеріям прийнятності (за ДФУ), звідки можна зробити висновок, що дану методику можна використовувати для кількісного визначення глутамінової кислоти у твердих лікарських формах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Глутамінова кислота (Glutamic acid) / Компендіум: лікарські препарати.
URL: <https://compendium.com.ua/dec/271766/>
2. Белкін Є.С. Застосування *Corynebacterium glutamicum* для отримання глутамінової кислоти. Дипломна магістерська робота, Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра біотехнології, шкіри та хутра. Київ, 2021.
3. Рева Т.Д., Сліпчук В.Л., Зайцева Г.М., Чхало О.М. та ін. Інструментальні методи аналізу. Методичний посібник для студентів фармацевтичного факультету. - Київ, 2012.
4. Вікіпедія.URL:
https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%BB%D1%83%D1%82%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0_%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0
5. Електронний ресурс. URL: <https://bcaa.ua/ua/podderzhka/glutaminovaya-kislota-dlya-sportsmena>
6. Okubo, Y.; Sekiya, H.; Namiki, S.; Sakamoto, H.; Iinuma, S.; Yamasaki, M.; Watanabe, M.; Hirose, K.; Iino, M. «Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain». Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010.
7. Meldrum, B. S. «Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology». The Journal of nutrition 130 (4S Suppl): 1007S-1015S. 2000.
8. R. H. A. Plimmer. The Chemical Constitution of the Protein / R.H.A. Plimmer; F.G. Hopkins. 2nd.London: Longmans, Green and Co., 1912. P. 114.
9. Електронний ресурс. URL:
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3500/kislota-glutaminova>

10. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.
11. Горячковский А. М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике: справочное пособие. Одесса: Экология, 2005. 607 с.
12. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків, 2015. в 3 т. Т.1. 1128 с.
13. Муханова В. С. Технологія виробництва глутамінової кислоти. Дільниця культивування : дипломний проект бакалавра: 162 Біотехнології та біоінженерія., Київ, 2021., 98 с.
14. Електронний ресурс. URL: <https://belok.ua/blog/ua/shho-take-aminokysloty/>
15. Западнюк В. И., Кураш Л. П., Заика М. И. Аминокислоты в медицине. Київ, Здоров'я, 1982. 200 с.
16. В.В. Болотов, О.М. Свєтнікова, С.В. Колісник та ін. Аналітична хімія. Х., 2004.
17. Дей, Р., Андервуд, А. (1989). Кількісна аналітична хімія. (п'яте видання). PEARSONPrenticeHall.
18. Електронний ресурс. Режим доступу: https://www.slideshare.net/anna_chem/ss-47510120
19. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : РІРЕГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.
20. Георгіянц В.А, О.А. Євтіфєєва. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.

ДОДАТКИ

Додаток 1

Витяг з Європейської Фармакопеї

Glutamic acid

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

acid R, 2.0 mL of *decolorised fuchsin solution R1* and 2.0 mL of a 0.5 per cent *V/V* solution of *formaldehyde R*. Allow to stand for 30 min.

Measure the absorbance (2.2.25) of the 2 solutions at the absorption maximum at 583 nm using for both measurements a solution prepared in the same manner using 10.0 mL of *water R* as the compensation liquid. The absorbance of the test solution is not greater than that of the reference solution.

Chlorides (2.4.4): maximum 125 ppm.

Dilute 4 mL of solution S to 15 mL with *water R*.

Sulfates (2.4.13): maximum 200 ppm.

Dilute 7.5 mL of solution S to 15 mL with *distilled water R*.

Arsenic (2.4.2, *Method A*): maximum 1 ppm, determined on 1.0 g.

Barium. To 10 mL of solution S add 1 mL of *dilute sulfuric acid R*. When examined immediately and after 1 h, any opalescence in the solution is not more intense than that in a mixture of 1 mL of *distilled water R* and 10 mL of solution S.

Calcium (2.4.3): maximum 200 ppm.

Dilute 5 mL of solution S to 15 mL with *distilled water R*.

Lead (2.4.10): maximum 0.5 ppm.

Water (2.5.12): 7.0 per cent to 9.5 per cent, determined on 0.50 g.

Sulfated ash: maximum 0.1 per cent.

Dissolve 5.0 g in 5 mL of *water R*, add 2 mL of *sulfuric acid R*, evaporate to dryness on a water-bath and ignite to constant mass. If necessary, repeat the heating with *sulfuric acid R*.

Pyrogens (2.6.8). If intended for use in the manufacture of large-volume parenteral preparations without a further appropriate procedure for the removal of pyrogens, the competent authority may require that it comply with the test for pyrogens. Inject per kilogram of the rabbit's mass 10 mL of a solution in *water for injections R* containing 55 mg of the substance to be examined per millilitre.

discs. If the spectra obtained show differences, dissolve the substance to be examined and the reference substance separately in the minimum quantity of *water R*, evaporate to dryness at 60 °C and record new spectra using the residues.

- C. Examine the chromatograms obtained in the test for ninhydrin-positive substances. The principal spot in the chromatogram obtained with test solution (b) is similar in position, colour and size to the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution (a).
- D. To 2.0 mL of solution S (see Tests) add 0.1 mL of *phenolphthalein solution R* and 3.0 mL to 3.5 mL of 1 M *sodium hydroxide* to change the colour of the indicator to red. Add a mixture of 3 mL of *formaldehyde solution R*, 3 mL of *carbon dioxide-free water R* and 0.1 mL of *phenolphthalein solution R*, to which sufficient 1 M *sodium hydroxide* has been added to produce a pink colour. The solution is decolourised. Add 1 M *sodium hydroxide* until a red colour is produced. The total volume of 1 M *sodium hydroxide* used is 4.0 mL to 4.7 mL.

TESTS

Solution S. Dissolve 5.00 g in 1 M *hydrochloric acid* with gentle heating, and dilute to 50.0 mL with the same acid.

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, *Method II*).

Specific optical rotation (2.2.7): + 30.5 to + 32.5, determined on solution S and calculated with reference to the dried substance.

Ninhydrin-positive substances. Examine by thin-layer chromatography (2.2.27), using a *TLC silica gel plate R*.

Test solution (a). Dissolve 0.10 g of the substance to be examined in 5 mL of *dilute ammonia R2* and dilute to 10 mL with *water R*.

Test solution (b). Dilute 1 mL of test solution (a) to 50 mL with *water R*.

Reference solution (a). Dissolve 10 mg of *glutamic acid CRS* in *water R* and dilute to 50 mL with the same solvent.

Reference solution (b). Dilute 5 mL of test solution (b) to 20 mL with *water R*.

Reference solution (c). Dissolve 10 mg of *glutamic acid CRS* and 10 mg of *aspartic acid CRS* in *water R* and dilute to 25 mL with the same solvent.

Apply to the plate 5 µL of each solution. Dry the plate in a current of air for 15 min. Develop over a path of 15 cm using a mixture of 20 volumes of *glacial acetic acid R*, 20 volumes of *water R* and 60 volumes of *butanol R*. Allow the plate to dry in air, spray with *ninhydrin solution R* and heat at 100-105 °C for 15 min. Any spot in the chromatogram obtained with test solution (a), apart from the principal spot, is not more intense than the spot in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.5 per cent). The test is not valid unless the chromatogram obtained with reference solution (c) shows 2 clearly separated spots.

Chlorides (2.4.4). Dissolve 0.25 g in 3 mL of *dilute nitric acid R* and dilute to 15 mL with *water R*. The solution, to which 1 mL of *water R* is added instead of *dilute nitric acid R*, complies with the limit test for chlorides (200 ppm).

Sulfates (2.4.13). Dilute 5 mL of solution S to 15 mL with *distilled water R*. The solution complies with the limit test for sulfates (300 ppm).

Ammonium (2.4.1). 50 mg complies with limit test B for ammonium (200 ppm). Prepare the standard using 0.1 mL of *ammonium standard solution (100 ppm NH₄) R*.

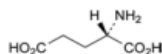
Iron (2.4.9). In a separating funnel, dissolve 1.0 g in 10 mL of *dilute hydrochloric acid R*. Shake with 3 quantities, each of 10 mL, of *methyl isobutyl ketone R1*, shaking for 3 min each time. To the combined organic layers add 10 mL of *water R* and shake for 3 min. The aqueous layer complies with the limit test for iron (10 ppm).

Monographs
F-H

01/2008:0750
corrected 6.0

GLUTAMIC ACID

Acidum glutamicum



C₅H₉NO₄
[56-86-0]

M, 147.1

DEFINITION

Glutamic acid contains not less than 98.5 per cent and not more than the equivalent of 100.5 per cent of (2S)-2-aminopentanedioic acid, calculated with reference to the dried substance.

CHARACTERS

A white or almost white, crystalline powder or colourless crystals, freely soluble in boiling water, slightly soluble in cold water, practically insoluble in acetic acid, in acetone and in alcohol.

IDENTIFICATION

First identification: A, B.

Second identification: A, C, D.

A. Specific optical rotation (see Tests).

B. Examine by infrared absorption spectrophotometry (2.2.24), comparing with the spectrum obtained with *glutamic acid CRS*. Examine the substances prepared as

Heavy metals (2.4.8). 2.0 g complies with test D for heavy metals (10 ppm). Prepare the reference solution using 2 mL of lead standard solution (10 ppm Pb) R.

Loss on drying (2.2.32). Not more than 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

Sulfated ash (2.4.14). Not more than 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Dissolve 0.130 g in 50 mL of carbon dioxide-free water R with gentle heating. Cool. Using 0.1 mL of bromothymol blue solution R1 as indicator, titrate with 0.1 M sodium hydroxide until the colour changes from yellow to blue.

1 mL of 0.1 M sodium hydroxide is equivalent to 14.71 mg of C₃H₇NO₄.

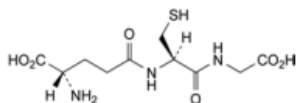
STORAGE

Protected from light.

04/2008:1670

GLUTATHIONE

Glutathionum



C₁₀H₁₇N₃O₆S
[70-18-8]

M, 307.3

DEFINITION

L-γ-Glutamyl-L-cysteinylglycine.

Fermentation product.

Content: 98.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, crystalline powder or colourless crystals.

Solubility: freely soluble in water, very slightly soluble in ethanol (96 per cent) and in methylene chloride.

IDENTIFICATION

A. Specific optical rotation (see Tests).

B. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: glutathione CRS.

TESTS

Solution S. Dissolve 5.0 g in distilled water R and dilute to 50 mL with the same solvent.

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, Method II).

Specific optical rotation (2.2.7): – 15.5 to – 17.5 (dried substance).

Dissolve 1.0 g in water R and dilute to 25.0 mL with the same solvent.

Related substances. Capillary electrophoresis (2.2.47). Prepare the solutions immediately before use.

Internal standard solution (a). Dissolve 0.100 g of phenylalanine R in the electrolyte solution and dilute to 50.0 mL with the same solution.

Internal standard solution (b). Dilute 10.0 mL of internal standard solution (a) to 100.0 mL with the electrolyte solution.

Test solution (a). Dissolve 0.200 g of the substance to be examined in the electrolyte solution and dilute to 10.0 mL with the same solution.

Test solution (b). Dissolve 0.200 g of the substance to be examined in internal standard solution (b) and dilute to 10.0 mL with the same solution.

Reference solution (a). Dissolve 20.0 mg of the substance to be examined in internal standard solution (a) and dilute to 10.0 mL with the same solution.

Reference solution (b). Dilute 5.0 mL of reference solution (a) to 50.0 mL with the electrolyte solution.

Reference solution (c). Dissolve 0.200 g of the substance to be examined in 5 mL of the electrolyte solution. Add 1.0 mL of internal standard solution (a), 0.5 mL of a 2 mg/mL solution of L-cysteine R (impurity B) in the electrolyte solution, 0.5 mL of a 2 mg/mL solution of oxidised L-glutathione R (impurity C) in the electrolyte solution and 0.5 mL of a 2 mg/mL solution of L-γ-glutamyl-L-cysteine R (impurity D) in the electrolyte solution. Dilute to 10.0 mL with the electrolyte solution.

Capillary:

- **material:** uncoated fused silica;
- **size:** length to the detector cell = 0.5 m; total length = 0.6 m; Ø = 75 µm.

Temperature: 25 °C.

Electrolyte solution. Dissolve 1.50 g of anhydrous sodium dihydrogen phosphate R in 230 mL of water R and adjust to pH 1.80 with phosphoric acid R. Dilute to 250.0 mL with water R. Check the pH and, if necessary, adjust with phosphoric acid R or dilute sodium hydroxide solution R.

Detection: spectrophotometer at 200 nm.

Preconditioning of a new capillary: rinse the new capillary before the first injection with 0.1 M hydrochloric acid at 138 kPa for 20 min and with water R at 138 kPa for 10 min; for complete equilibration, condition the capillary with the electrolyte solution at 350 kPa for 40 min, and subsequently at a voltage of 20 kV for 60 min.

Preconditioning of the capillary: rinse the capillary with the electrolyte solution at 138 kPa for 40 min.

Between-run rinsing: rinse the capillary with water R at 138 kPa for 1 min, with 0.1 M sodium hydroxide at 138 kPa for 2 min, with water R at 138 kPa for 1 min, with 0.1 M hydrochloric acid at 138 kPa for 3 min and with the electrolyte solution at 138 kPa for 10 min.

Injection: test solutions (a) and (b), reference solutions (b) and (c) and the electrolyte solution (blank): under pressure (3.45 kPa) for 5 s.

Migration: apply a voltage of 20 kV.

Run time: 45 min.

Relative migration with reference to the internal standard (about 14 min): impurity A = about 0.77; impurity B = about 1.04; impurity E = about 1.2; impurity C = about 1.26; impurity D = about 1.3.

System suitability:

- **resolution:** minimum 1.5 between the peaks due to the internal standard and impurity B in the chromatogram obtained with reference solution (c); if necessary, increase the pH with dilute sodium hydroxide solution R;
- **peak-to-valley ratio:** minimum 2.5, where H_p = height above the baseline of the peak due to impurity D and H_v = height above the baseline of the lowest point of the curve separating this peak from the peak due to glutathione in the chromatogram obtained with reference solution (c); if necessary, lower the pH with phosphoric acid R;
- check that in the electropherogram obtained with test solution (a) there is no peak with the same migration time as the internal standard (in such case correct the area of the phenylalanine peak).

Limits: test solution (b):

- **corrected areas:** divide all the peak areas by the corresponding migration times;

Додаток 2.

Мірний посуд класу А.



Додаток 3.
рН-метр рН -150 МІ



Основні технічні характеристики:

Діапазон рН 1,00 – 14,00

Дискретність 0,01

Похибка перетворювача $\pm 0,02$

Похибка приладу $\pm 0,05$

Додаток 5.
Сертифікат учасника конференції.

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

СЕРТИФІКАТ № 2023-1101- 5508998-100118

ЦИМ ПОСВІДЧУЄТЬСЯ, ЩО

КРАВЧУК К.С.

БРАВ(ЛА) УЧАСТЬ У НАУКОВО-ПРАКТИЧНІЙ КОНФЕРЕНЦІЇ
З МІЖНАРОДНОЮ УЧАСТЮ, ПРИСВЯЧЕНІЙ 25-РІЧЧЮ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ФАКУЛЬТЕТУ

**ФАРМАЦЕВТИЧНА ОСВІТА, НАУКА ТА ПРАКТИКА:
СТАН, ПРОБЛЕМИ, ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ**

ГОЛОВА ОРГАНІЗАЦІЙНОГО КОМІТЕТУ,
РЕКТОР НАЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО
УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
ОСВІТИ НМУ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,
ЧЛЕН-КОРЕСПОНДЕНТ НАМН УКРАЇНИ,
Д.МЕД.Н., ПРОФЕСОР



ЮРІЙ КУЧИН

ЦІЛЬОВА АУДИТОРІЯ: АНАЛІТИЧНО-КОНТРОЛЬНА ФАРМАЦІЯ, ЗАГАЛЬНА ФАРМАЦІЯ, КЛІНІЧНА ФАРМАЦІЯ, ОРГАНІЗАЦІЯ І УПРАВЛІННЯ ФАРМАЦІЄЮ, ОРГАНІЗАЦІЯ І УПРАВЛІННЯ ОХОРОНОЮ ЗДОРОВ'Я, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОСМЕТОЛОГІЯ, ФАРМАЦЕВТИЧНА ТОКСИКОЛОГІЯ

19-20 грудня 2023 року

SUMMARY

Kateryna Kravchuk

Topic: « Quantitative determination of glutamic acid in solid dosage forms»

Department of analytical, physical and colloid chemistry

Scientific supervisor: Oksana Chkhalo

Keywords: glutamic acid, solid dosage forms, potentiometric titration.

Introduction. Glutamic acid, although considered a nonessential α -amino acid, cannot be replaced by any other amino acid for some human organs, as it performs a number of important functions. These include neurotransmitter function, the formation of other amino acids, participation in the synthesis of serotonin and in the synthesis of nucleic acids and enzymes, and the neutralization of ammonia, among many others. Therefore, glutamic acid is used in the treatment of a large number of diseases, such as epilepsy, various types of psychosis, reactive states, exhaustion, polio, cerebral palsy, and others. The search for new, accurate methods for the quantitative determination of glutamic acid is an urgent task for analysts.

The aim of the study is to develop a method for the quantitative determination of glutamic acid in solid dosage forms by potentiometric titration.

Results. Glutamic acid is determined by the method of acid-base titration with sodium hydroxide solution in accordance with the SPS and the European Pharmacopoeia. As an indicator, a solution of bromothymol blue is used until the color changes from yellow to blue (transition interval 6.0 - 7.6). Other methods of its quantitative determination are also known, namely: formal titration (Serensen method), Kjeldahl method - determination of organically bound nitrogen, cuprimetric titration, photolorimetric determination using a color reaction with alloxan.

For potentiometric titration, the analyzed solutions of solid dosage form samples and the standard solution were prepared from exact sample weights and the pharmacopoeial standard sample of DFU (Glutamic acid, G0181, registration number 56-86-0), which were placed in a conical flask, added water and heated in a water bath

until the drug sample was dissolved. The volume of the solution was made up to 50 ml with distilled water and cooled to room temperature. An aliquot was taken with a 5 ml measuring pipette, transferred to a beaker, diluted with a small amount of water so that the electrodes were immersed in the solution by 1,5-2 cm. Potentiometric titration was performed with a sodium hydroxide solution with a molar concentration of 0.1 mol/l, using a pH meter pH-150 MI with glass and silver chloride electrodes.

Based on the titration results, potentiometric titration curves were obtained for each solution. The volume of sodium hydroxide used for titration at the point of equivalence of each curve was calculated by the Gran method and the mass of glutamic acid in the analyzed samples was determined. The results of the quantitative determination of glutamic acid in the samples of solid dosage forms taken for the study and in the standard solution completely coincide with the content of glutamic acid specified in the instructions for medical use.

Conclusions. As a result of the study, a method for the quantitative determination of glutamic acid in solid dosage forms by potentiometric titration was developed and tested.