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 L-аргініну у дієтичних добавках методом високоефективної рідинної хроматографії »**

Виконала: здобувач вищої освіти 3-го курсу, групи 118Б2Б напряму підготовки 22 «Охорона здоров'я» спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація», освітня програма «Фармація»
Ярмак Ганна Станіславівна
Керівник: кандидат педагогічних наук, доцентка
Чхало Оксана Миколаївна

Рецензент: кандидат хімічних наук,
доцентка кафедри ліків та лікарської токсикології
Нароха Віолетта Петрівна

Київ – 2024

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень		4
Вступ.		5
ОСНОВНА ЧАСТИНА. РОЗДІЛ 1. L-аргінін, методи визначення.		8
1.1	Роль L-аргініну в організмі та його метаболізм.	8
1.2	Будова, фізико-хімічні властивості та отримання L-аргініну.	10
1.3	Методи ідентифікації L-аргініну.	12
1.4	Методи кількісного визначення L-аргініну	13
1.5.	Фармакологічний ефект, терапевтична дія, застосування L-аргініну та побічні реакції.	14
1.6.	Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).	15
РОЗДІЛ 2. Експериментальна частина.		17
2.1.	Матеріали та методи.	17
2.1.1.	Мета дослідження.	17
2.1.2.	Об’єкти дослідження.	17
2.1.3.	Посуд та обладнання.	18
2.1.4.	Реактиви.	18
2.1.5.	Приготування випробуваного розчину	18
2.1.6.	Приготування розчину порівняння	19
2.1.7.	Приготування рухомої фази	19
2.1.8.	Умови хроматографування та методика.	19
2.2.	Переваги хроматографа	20
2.3.	Пробопідготовка.	21
2.4.	Захист хроматографічної колонки.	21
РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення.		22
3.1.	Перевірка придатності хроматографічної системи	22

3.2.	Вибір довжини хвилі детектування та оптимального температурного режиму.	22
3.3.	Калібрувальна (градуювальна) залежність площі піка від концентрації стандартного розчину L-аргініну. Визначення лінійності залежності.	23
3.4.	Кількісне визначення L-аргініну у дієтичних добавках. Оцінка валідаційних характеристик.	26
3.4.1.	Оцінка специфічності методики.	26
3.4.2.	Прецизійність та робасність.	28
3.4.3.	Перевірка правильності методики.	33
3.5.	Порівняльний аналіз методик кількісного визначення L-аргініну.	33
	Висновки.	35
	Список використаних джерел.	36
	Додатки.	39
	Summary.	45

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ДФУ – державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

GLP – належна лабораторна практика

GMP – належна виробнича практика

ISO – міжнародна організація зі стандартизації

ТЛФ – тверда лікарська форма

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

C^0 – градуси Цельсія

ВСТУП

У галузі судинної медицини впродовж останніх років проведені дослідження, які дозволили встановити важливу роль нітроген оксиду (NO) у забезпеченні судинного гомеостазу. Встановлено, що недостача NO призводить до розвитку ендотеліальної дисфункції, що веде до підвищення тонусу коронарних судин, стимуляції хемотаксису лейкоцитів, а також зростання агрегаційної та адгезивної здатності тромбоцитів. Єдиним ендогенним джерелом NO в організмі людини є частково замінна амінокислота L-аргінін. Саме тому привабливою видається можливість поповнення ззовні дефіциту NO за рахунок надходження в організм L-аргініну [1].

Характерною особливістю L-аргініну є те, що NO, який утворюється в процесі метаболізму, забезпечує підтримку адекватного коронарного кровотоку та його адаптацію до змінних навантажень. L-аргінін призначають при хворобах, пов'язаних з порушеннями циркуляції крові: коронарної хвороби серця, стабільної стенокардії, інфаркті міокарда, серцевої недостатності, порушенні мозкового кровообігу [2].

Великою проблемою харчування недоношених дітей є важкий дефіцит аргініну (гіпоаргінінемія), що призводить до гіперамоніємії, а також до серцево-судинної, легеневої, неврологічної та кишкової дисфункції. Дефіцит аргініну може сприяти високому рівню дитячої захворюваності та смертності, пов'язаної з передчасними пологами [3].

Використання амінокислот в медичній практиці пов’язане з їх фармакологічною дією та здатністю підвищувати засвоєння організмом інших необхідних біологічно активних речовин. Як і багато інших амінокислот, L-аргінін приймають, як дієтичні добавки, також і спортсмени для підвищення витривалості організму, відновлення після травм, а також при адаптації до тренувальних

навантажень. Крім того, у комплексі з фізичними вправами L-аргінін сприяє зниженню ваги у людей, які страждають на ожиріння [4]. У кількох клінічних випробуваннях було показано, що прийом L-аргініну покращує симптоми серцево-судинних захворювань. Однак вплив добавок L-аргініну на фізіологію людини може мати різний характер залежно від дозування. Дозування 3-8 г на добу вважається безпечним та не викликає гострих фармакологічних ефектів у людей [5]. Але вживання дієтичних добавок може бути пов'язано з певним ризиком через відсутність належного контролю за якістю. І часто немає ніяких гарантій того, що дозування препарату точно відповідає заявленому на упакуванні. Крім того, саме наслідком неправильного маркування добавок була досить велика кількість зафіксованих позитивних результатів допінг-контролю у спортсменів.

Актуальність: Пошук нових методик кількісного визначення L-аргініну в дієтичних добавках.

Мета: розробити методику кількісного визначення L-аргініну у дієтичних добавках L-Аргінін (виробник ТОВ Еліт-Фарм) та L-Аргінін (бренд PALIANYTSIA виробник ПП Біолайт) методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Завдання:

1. Проаналізувати літературні дані щодо застосування L-аргініну, його фізико-хімічних та фармакологічних властивостей, метаболізм та механізм дії L-аргініну.
2. Проаналізувати відомі методики кількісного визначення L-аргініну.
3. Використовуючи дані проведених досліджень розробити методику кількісного визначення L-аргініну у дієтичних добавках L-Аргінін (виробник ТОВ Еліт-Фарм) та L-Аргінін (бренд PALIANYTSIA виробник ПП Біолайт) методом ВЕРХ.

4. Здійснити валідацію методики кількісного визначення L-аргініну методом ВЕРХ.

Предмет дослідження: Високоефективна рідинна хроматографія та її застосування для кількісного визначення складу дієтичних добавок.

Новизна та значення одержаних результатів: результатом роботи є сучасна методика та робочі умови кількісного визначення L-аргініну методом ВЕРХ у дієтичних добавках.

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 4).

Структура роботи. Робота включає Таблиць -5, Рисунків – 4, Додатків – 4, загальний обсяг 46 сторінок.

ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. L-аргінін, методи визначення.

1.1. Роль L-аргініну в організмі та його метаболізм.

В наші дні амінокислоти часто використовують для лікування та профілактики багатьох захворювань [6, 7]. Визначено, що біологічну активність в організмі людини і тварин мають лише L-ізомери амінокислот, а D-ізомери, деякі з них, токсичні для людини і тварин, а інші не переробляються ферментними системами. Лише, як виняток у цьому відношенні, метіонін, має біологічно активні як D-, так і L-ізомери. На постійному рівні підтримується сумарний вміст амінокислот у біологічних рідинах. Зміна у вмісті вільних α-амінокислот у сироватці та плазмі крові, а також сечі вказує на порушення функції печінки, нирок. Вмістом α-амінокислот та їх гідроксипохідних визначається синтез основного білку сполучної тканини - колагену. При патологічних станах, що супроводжуються порушенням синтезу колагену, спостерігається зниження кількості окремих α-амінокислот у сироватці крові.

Встановлено, що більшість α-амінокислот мають широкий спектр біологічної активності. Наприклад, аргінін, лізин, треонін, гліцин, глутамін, фенілаланін, тирозин, аспарагін, серин є вихідними речовинами для синтезу антитіл, гормонів, ферментів та інших речовин [8]. Вони беруть участь у метаболізмі цукрів та органічних кислот (аланін), сприяють зниженню рівня холестерину в крові (метіонін, триптофан, лізин, аргінін), виведення важких металів з організму (метіонін, цистеїн), росту та відновлення тканин (гістидин, ізолейцин, лейцин, гліцин, серин, пролін).

В огляді [8] розглянуто біологічну роль L-аргініну та основних продуктів його метаболізму – нітроген оксиду, агматину та поліамінів, що беруть участь у багатьох біохімічних реакціях.

Так, встановлено, що агматин (продукт декарбоксилювання аргініну) зв'язується з α_2-адренергічними та імідазоліновими рецепторами та виявляє виражений гіпотензивний ефект. В результаті окислення аргініну утворюється нітроген (II) оксид – один з важливих регуляторів клітинного

метаболізму. Він володіє цілим рядом біологічних активностей: зниження артеріального тиску, інгібування агрегації тромбоцитів, участь в імунному захисті організму (цитотоксичний та протизапальний агент).

Ще одна трансформація L-аргініну пов'язана з синтезом поліамінів, які відіграють важливу роль у клітинній проліферації ссавців. Порушення поліамінового метаболізму може бути фактором канцерогенезу, а зниження концентрації поліамінів призводить до блокади росту метастазних пухлинних клітин. Було встановлено, що нітроген (II) оксид та поліаміни мають протилежну дію на регуляцію канцерогенезу і, так як вони утворюються з одного попередника, можливо існує один механізму регулювання відносних швидкостей їхнього синтезу. Так, є дані про те, що блокування NO синтазного шляху може призводити до виникнення передпухлинних змін за рахунок зниження вивільнення нітроген оксиду. Тому перспективним напрямом медицини є пошук інгібіторів поліамінного синтезу, як потенційних протипухлинних засобів.

Автор [8] підкреслює, що не лише метаболіти L-аргініну, а й сама ця амінокислота має виразну біологічну активність. Так, введення аргініну призводить до посилення вивільнення різних гормонів (інсулін, соматотропін), вазодилатації, збільшення струму плазми та швидкості фільтрації через нирки. Крім того, L-аргінін посилює судинорозширювальний ефект, в тому числі і в коронарних артеріях, при гіперхолестеринеміях, цукровому діабеті. При цьому вважають, що хоча при введенні аргініну підвищується кількість нітроген оксиду, що утворюється, визначальним є не тільки цей фактор, але і його непряма антиоксидантна активність, так як при введенні аргініну знижується вивільнення супероксид-аніон-радикалу в ендотелії і, як наслідок, покращується макро- та мікроциркуляція крові. Наразі розробляють композиції, що містять аргінін, для лікування серцево-судинних захворювань. Розробляються пероральні та топікальні лікарські засоби, які діють як вазорелаксанти та вазодилататори, до складу яких входить L-аргінін і женьшень, що стимулюють утворення

нітроген оксиду. Для підвищення терапевтичного ефекту, ці лікарські препарати вводять екстракт Ginkgo biloba, L-аланін, глутамінову кислоту і L-лізин [9]. Препарати, що містять комбінацію L-аргініну та рибоксину, мають вазодилатуючі властивості та позитивно впливають на кардіо- і системну гемодинаміку, а саме поліпшує скоротливу здатність міокарда, покращує коронарний кровообіг, сприяє зниженню артеріального тиску [10].

Незважаючи на ефективність лікарських засобів аргініну, необхідно враховувати сполученість паралельного синтезу нітроген оксиду та поліамінів, та здійснювати постійний моніторинг вмісту аргініну в організмі.

Таким чином, L-аргінін та лікарські препарати на його основі мають різні види фармакологічної активності. Тому важливим і актуальним завданням сучасного хіміко-фармацевтичного аналізу є розробка точних і доступних методів кількісного визначення L-аргініну у субстанціях, лікарських формах та рослинній сировині.

1.2. Будова, фізико-хімічні властивості та отримання L-аргініну.

Аргінін (S)-2-аміно-5-(діамінометиліліденоаміно)пентанова кислота [12], (α-аміно-δ-гуанідино-валеріанова кислота (скорочення Арг, Arg, R).

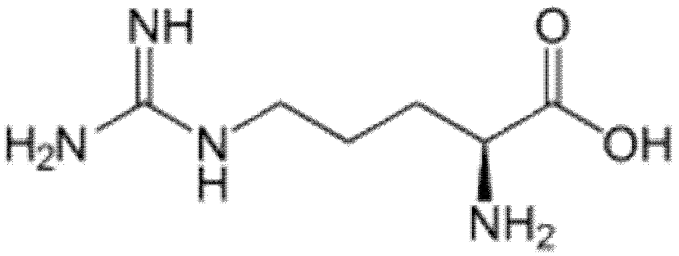


Рис.1. L-аргінін

Аргінін для організму людини є умовно незамінною амінокислотою, тобто біохімічні способи для її біосинтезу є, але в певні періоди життя, наприклад інтенсивного росту та розвитку, а також під час деяких захворювань вони не можуть забезпечувати достатньої кількості цієї сполуки, через що вона повинна потрапляти в організм із їжею [11].

Брутто-формула: $C_6H_{14}N_4O_2$. Назва за номенклатурою IUPAC: (S)-2-аміно-5-(діамінометиліліденоаміно)пентанова кислота (δ-гуанідін-α-аміновалеріанова кислота).

Молекулярна маса: 174.2. Біла кристалічна речовина, $t°_{пл.}$ = 244 ^{0}C, $t°_{кип.}$ = 368 ^{0}C, добре розчиняється у воді (14.87 г/100 мЛ), малорозчинна в спиртах, нерозчинна в етері. $[\alpha]_D^{20}$ = від +25,5° до +28,5° (8 % розчин у хлористоводневій кислоті). Запаху та смаку не має. Аргінін є найосновнішою α-амінокислотою через наявну в її складі гуанідінового угрупування в δ-положенні (pK_a= 12.488) [12].

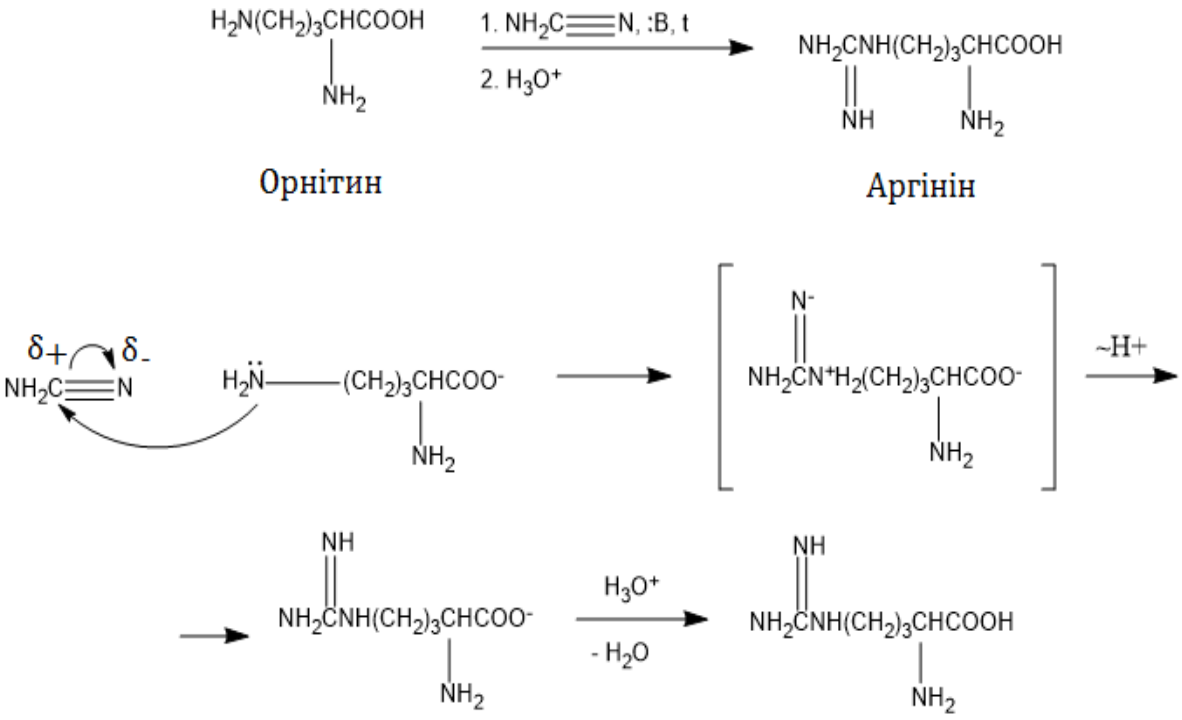
Аргінін вперше був виділений із проростків люпину у 1886 році, його хімічну будову встановлено у 1897 році шляхом лужного гідролізу до орнітину та сечовини. У 1910 р. структура аргініну була підтверджена шляхом його синтезу із бензилорнітину. У 1924 р. було відкрито, що аргінін є головною амінокислотою в основних білках сперми риб. А в 1930 р. показано, що аргінін належить до замінних амінокислот, тобто може синтезуватись в організмі ссавців. У 1932 відкрито цикл сечовини, у якому аргінін є проміжним метаболітом, що поклало початок детальному вивченню метаболізму цієї амінокислоти [12].

Аргінін має у складі два основних центра. Це аміногрупа в α-положенні та гуанідінова група в δ-положенні. Як α-амінокислота містить аміно- та карбоксильну групи біля одного атома Карбону. Цей атом є хіральним (оптично-активним), в залежності від просторового розташування замісників біля нього розрізняють L (-) (ліву) та D (+) (праву) форми. До складу природних сполук входить L(-) форма. Гуанідінова група є сильноосновною, існує в вигляді протонованої катіонній формі при pH<10 та може утворювати

водневі зв'язки. Позитивний заряд гуанідінової групи рівномірно розділений між трьома атомами Нітрогену та атомом Карбону. У слабколужних та нейтральних розчинах аргінін існує у вигляді цвіттер-йона. Аргінін – найбільш основна та найбільш гідрофільна із 20 стандартних амінокислот.

Виробництво L-аргініну здійснюється за допомогою екстракції з білкових гідролізатів та за допомогою мікробного синтезу. Біосинтез L-аргініну відбувається у реакціях орнітинового циклу. Ендогенний синтез L-аргініну здійснюється головним чином під дією аргініносукцинатсинтази та аргініносукцинатліази з цитруліну. Синтез L-аргініну також можливий з орнітину та L-проліну [11]:

.

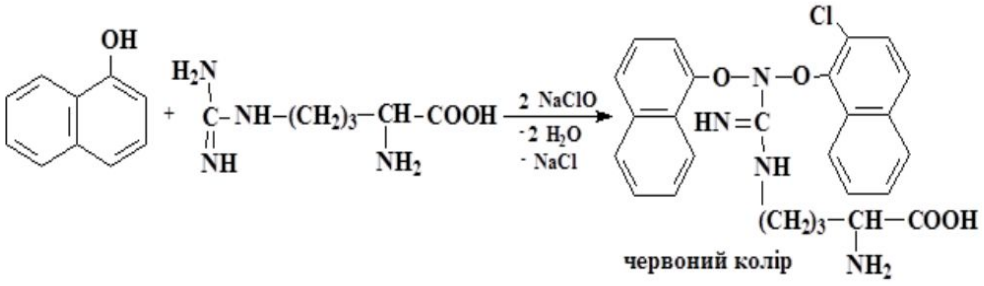


1.3. Методи ідентифікації L-аргініну

Згідно з ДФУ [13] аргінін ідентифікують за значенням питомого обертання; за ІЧ-спектром досліджуваної субстанції, який має відповідати спектру фармакопейного стандартного зразка (ФСЗ) аргініну; методом тонкошарової хроматографії (ТШХ), використовуючи реакцію з

нінгідрином – має виявлятись одна пляма відповідного розміру і забарвленняна на рівні плями хроматограми розчину порівняння; водний розчин субстанції має сильнолужну реакцію середовища.

У розчині або у складі білків аргінін можна якісно визначити завдяки реакції Сакагучі (взаємодія натрій гіпохлориту і 2-нафтолу з гуанідином у лужному середовищі з утворенням сполук червоного забарвлення) [18].



1.4. Методи кількісного визначення L-аргініну

Кількісні визначення L-аргініну проводять багатьма методами.

Згідно з ДФУ [13] (Додаток 2.) та згідно з Європейською фармакопеєю (Ph.Eur.) (Додаток 1.) L-аргінін визначають методом ацидиметричного титрування 0,1 М розчином хлоридної кислоти, використовуючи в якості індикатора розчин метилового червоного змішаного Р. Титрування проводять до переходу забарвлення від зеленого до фіолетово-червоного. 1 мл розчину хлоридної кислоти з концентрацією 0,1 моль/л відповідає 0,01742 г аргініну.

Спектрофотометричне визначення L-аргініну спочатку ґрунтувалось на реакції Сакагучі з α-нафтолом та натрій гіпохлоритом. Пізніше для цього методу стали використовувати хромогенні агенти, які містили діацетил-α-нафтол, 8-гідроксихінолін та натрію гіпобромі т, α -нафтол та 2,3-бутандіонмонооксим — метод Вогес-Проскауера, 2-метил-α-нафтол, 5-хлоро-7-йодо-8-гідроксихінолін, тимол-(2-пропіл-5-метил)фенол і натрію гіпобромі т (метод Састрі), *п*-нітрофенілгліоксаль та натрію аскорбат, 1,2,4-тригідроксіантрахінон (ТГАХ) та гідроген пероксид [14].

Поширені також хроматографічні методи визначення L-аргініну: хроматографія на папері, тонкошарова хроматографія, газорідинна хроматографія, проточно-інжекційний хемілюмінесцентний метод, метод ВЕРХ (провівши попередню дериватизацію L-аргініну). Існують також ензиматичні методи кількісного аналізу L-аргініну.

Але більшість методів кількісного визначення L-аргініну займає досить багато часу та потребує дорогого обладнання. В багатьох методах потрібна ще й відповідна додаткова пробопідготовка.

1.5. Фармакологічний ефект, терапевтична дія, застосування L-аргініну та побічні реакції.

Аргінін дуже важливий для нормального самопочуття людини, тому що бере участь у всіх фізіологічних процесах організму людини. Цю амінокислоту використовують для профілактики розвитку хвороб серцево-судинної та нервової системи, для підвищення тонусу організму та його здатності протидіяти несприятливим зовнішнім чинникам.

Можна назвати такі основні корисні властивості аргініну:

- стимулює кровообіг – аргінін розширює судини, перетворюючись в нітроген оксид, та запобігає закупорюванню артерій;
- усуває еректильну дисфункцію у чоловіків – завдяки посиленню притоку крові до чоловічих статевих органів;
- допомагає в лікуванні цукрового діабету 2-го типу – регулює кількість глюкози в крові;
- нормалізує артеріальний тиск – допомагає розслабленню м’язів судин завдяки виробленню оксиду азоту;
- є сильним антиоксидантом – аргінін прискорює виведення з організму вільних радикалів;
- гарно впливає на центральну нервову систему – покращує розумову діяльність, оскільки підвищує швидкість передачі імпульсів між нейронами головного мозку;

- підвищує імунітет – підвищує стійкість імунної системи до вірусів і патогенних мікробів;
- сповільнює ріст пухлин, у тому числі злоякісних – за рахунок стимуляції імунної системи організму. Він підвищує активність і збільшує розмір вилочкової залози, що виробляє Т-лімфоцити;
- допомагає знизити вагу - входить до складу багатьох ензимів і гормонів та стимулює вироблення інсуліну підшлунковою залозою і допомагає синтезові гормону росту.
- сприяє дезинтоксикаційним процесам у печінці, застосовують при захворюваннях печінки (цирозі і жировій дистрофії);
- підвищує стійкість до стресу – аргінін бере участь у виробленні гормону серотоніну, який відповідає за гарний настрій [15].

Аргінін можна отримати з продуктів харчування. Він міститься в насінні гарбуза, горіхах, м'ясі – яловичині, індичатині, курячому, в бобових, деяких видах риби, молочних продуктах. Але людина рідко отримує необхідну кількість цієї амінокислоти з харчуванням.

Додатковим джерелом аргініну виступають лікарські засоби та біологічно активні добавки (БАД), які випускаються у формі таблеток, капсул, розчинів або порошку. До їх складу входить L-аргінін в чистому вигляді або в комбінації з іншими важливими речовинами.

Коли в організмі не вистачає аргініну, то погіршується робота головного мозку, з'являється слабкість, збільшується ризик розвитку цукрового діабету, гіпертонії та інфарктів, відбувається передчасне старіння організму, відбувається самоотруєння організму. У першу чергу страждають системи, що відповідають за виведення амоніаку (печінка, нирки, кровотворна система).

1.6. Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) – метод, який має високу селективність, відтворюваність і

низьку межу виявлення. Цим методом проводять розділення, ідентифікацію та кількісне визначення речовин. Рухомою фазою у даному методі є рідина, яка подається під високим тиском, а нерухомою фазою є тверда сполука, наприклад силікагелі, алюміній оксид, вугілля, алюмогелі, алюмосилікати та інші.

1. Рідинний хроматограф складається з блоку подачі рухомої фази, системи вводу проби, хроматографічної колонки, детектора і пристрою, який проводить реєстрацію. Рухома фаза звичайно подається під тиском з посудини і проходить через блок вводу проби, колонку і детектор із певною швидкістю. Сигнал від детектора реєструється у вигляді хроматограми. Рідинні хроматографи оснащують рефрактометричними, кондуктометричними, флюориметричними або фотометричними детекторами. Для обробки хроматограм та розрахунку концентрацій визначуваних речовин використовують комп'ютерну техніку. Для кількісного аналізу користуються методом абсолютного калібрування, де будують графік залежності площі піків досліджуваної субстанції від її концентрації в розчині або вмісту у пробі, та методом внутрішнього стандарту [16]. При використанні методу абсолютного калібрування готують серію стандартних розчинів, для кожного з яких проводять ВЕРХ з метою вимірювання площі піків (виконують декілька вимірювань з подальшим визначенням середнього значення) та будують графік залежності площі піків досліджуваної субстанції від її концентрації в розчині або вмісту у пробі. Наступним кроком проводять хроматографування розчину з невідомою концентрацією досліджуваної речовини з тих же умов. За графіком знаходять концентрацію речовини у досліджуваному розчині, що відповідає виміряній площі хроматографічного піку. Зазвичай такі вимірювання проводять декілька разів.

Розділ 2. Експериментальна частина.

Робота була виконана у лабораторії рідинної хроматографії Інституту гігієни та екології НМУ імені О.О. Богомольця.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження. Метою роботи є розробка методики кількісного визначення L-аргініну методом ВЕРХ у дієтичних добавках.

2.1.2. Об`єкти дослідження. Для розробки методики було обрано L-Аргінін (виробник ТОВ Еліт-Фарм) та L-Аргінін (бренд PALIANYTSIA виробник ПП Біолайт). Дієтичні добавки реалізуються аптеками у капсулах та мають склад:

1) Зразок 1. Капсули L-Аргініну (виробник ТОВ Еліт-Фарм). Склад: L-Аргінін - 350,0 мг; наповнювачі: кальцій стеарат, МКЦ, лактоза, крохмаль, сорбіт [19].

2) Зразок 2. Таблетки L-Аргініну (бренд PALIANYTSIA виробник ПП Біолайт). Склад: діюча речовина L-аргінін – 350 мг. Допоміжні речовини: МКЦ, кремній диоксид, кальцій стеарат [20].

Зразок 1	Зразок 2

2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Мірний посуд класу точності А.
2. Водяна баня.
3. Хроматограф рідинний Shimadzu LC-10ADvp з спектрофотометричним детектором, зав. № C20964330924CS, свідоцтво про калібрування № 3991 від 05.07.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ СЕРВІС» (Додаток 3).
4. Колонка Nova-Pak C18 150×3,9 мм
5. Мікрошприц ємністю 10 мкл
6. Ваги лабораторні електронні аналітичні RADWAG AS 220.R2, зав. № 502964, свідоцтво про калібрування № 3816 від 03.06.2019р.
7. Мембранний фільтр.

2.1.4. Реактиви.

1. Фармакопейний стандартний зразок ДФУ Аргінін, каталожний номер А 0032, реєстраційний номер 74-79-3.

2. Вода для хроматографії Р, отримана за допомогою установки SimplicityUV, Millipore, USA.

3. Хлоридна кислота

4. Розчин натрій тетраборату.

5. Розчин динітрофторбензену.

6. Розчину амоній ацетату.

7. Ацетонітрил

2.1.5. Приготування випробуваного розчину

Після процедури пробопідготовки (п. 2.3) відбирають з розчину 1 мл та переносять в мірну колбу на 50 мл, додають 10 мл розчину натрій

тетраборату з концентрацією 0,01 моль/л та 0,4 мл розчину динітрофторбензену та перемішують. Отриманий розчин поміщають на водяну баню при температурі 80 - 85 °С та витримують протягом 45 хв. Після цього розчин охолоджують до кімнатної температури, доводять об'єм розчину до мітки рухомою фазою та перемішують [17].

2.1.6. Приготування розчину порівняння

Точну наважку 260,0 мг стандартного зразка аргініну переносять у мірну колбу ємністю 100 мл, додають 60 мл хлоридної кислоти з концентрацією 0,1 моль/л, доводять об'єм розчину до позначки водою Р і перемішують. 1,0 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу на 50 мл, додають 10 мл розчину натрій тетраборату з концентрацією 0,01 моль/л, 0,4 мл розчину динітрофторбензену, перемішують та протягом 45 хв витримують на водяній бані при температурі від 80 до 85 °С. Після цього розчин охолоджують до кімнатної температури, доводять об'єм розчину рухомою фазою до мітки і перемішують [17].

2.1.7. Приготування рухомої фази

В якості рухомої фази використовуємо дегазований розчин, що складається з розчину амоній ацетату з концентрацією 0,01 моль/л (pH 6,0) та ацетонітрилу *у* співвідношенні 80:20. Розчин амоній ацетату готують розчиненням 0,8 г амоніюй ацетату в мірній колбі на 1000 мл у воді Р, доводять об'єм розчину до мітки та перемішують. Доводять pH до 6,0 за допомогою ацетатної безводної кислоти потенціометрично.

2.1.8. Умови хроматографування та методика.

Хроматографічне визначення проводять в умовах:

Температурний режим хроматографічної колонки: 40^0С

Швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв

Розмір колонки: 150 × 4.6 мм, розмір частинок 5 мкм

Довжина хвилі детектора: 360 нм

Аналізований розчин та розчин порівняння відбирають мікрошприцем по 10 мкл та хроматографують на рідинному хроматографі із спектрофотометричним детектором. Для кожного розчину отримують як мінімум три хроматограми. На хроматограмі досліджуваного розчину та розчину порівняння отримуємо два піки які мають відносний час утримування: динітрофторбензен — 1,00, продукт реакції аргініну з динітробензеном—2,07.

Масу діючої речовини L- аргініну розраховують за формулою:

$$m, мг = R_2 \times m_1 \times A / R_1 \times m_2$$

де R_1 - площа піку стандартного розчину (середнє значення);

R_2 - площа піку досліджуваного розчину (середнє значення);

m_1 - маса стандарту;

m_2 - маса зразка;

А - чистота стандарту, вважається рівною 1.

2.2. Переваги хроматографа

Для виконання дослідження було обрано хроматограф Shimadzu LC-10ADvp, який має багато переваг:

1. Висока продуктивність. Швидкість інжектування може скласти 0,67 мкл/сек.

2. Автоматизація та комп`ютеризація. Хроматограф дозволяє зробити процес розділення та ідентифікації, промивку колонки та її кондиціонування повністю автоматичним і деколи навіть при відсутності інженера.

3. Автоматична валідація системи. Хроматограф LC-2010 має вбудовану функцію автовалідації відповідно до вимог GLP/GMP або ISO. Результати аналізу автоматично заносяться в звіти. Валідація приладів є одним з найважливійших та найнеобхіднійших дій при використанні обладнання та роботі лабораторій, відділів контролю тощо.

4. Простата в роботі та обробці результатів. Параметри аналізів можна задавати автоматично або в ручному режимі, режими хроматографування можуть бути статичними, ізократичними або градієнтними.

2.3. Пробопідготовка.

3 таблетки (відкритих капсули) поміщають у мірну колбу ємністю 500 мл, додають 125,0 мл розчину хлоридної кислоти з концентрацією 0,1 моль/л, струшують до повного розчинення та доводять об'єм розчину до мітки водою Р, перемішують його та фільтрують через мембранний фільтр (розмір пор 0,5 мкм.). Перші біля 10 мл фільтрату відкидають.

2.4. Захист хроматографічної колонки.

Оскільки на нерухомій фазі накопичуються домішки та механічні частки, це може призвести до скорочення активної площі її поверхні та зниження роздільної здатності і, як наслідок, скоротити термін служби колонки. Тому потрібно захищати хроматографічну колонку від домішок. Найкраще це зробити встановивши передколонку або захисний картридж між інжектором і колонкою.

В передколонці найкраще використовувати такий же сорбент, як і в хроматографічній колонці. Передколонки не повинні знижувати ефективність самої колонки.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

3.1. Перевірка придатності хроматографічної системи

Перед виконанням аналізу хроматографічна система спочатку перевіряється на придатність, для чого мають бути виконані певні умови [17]. Це стосується коефіцієнту розділення піків (R) реагенту та динітробензен похідного аргініну (він має бути як мінімум 2,0), ефективність хроматографічної колонки повинна бути не менше 2000 теоретичних тарілок, відносне стандартне відхилення (RSD), яке розраховується з площ піків похідного аргініну з реагентом повинно відповідати вимогам ДФУ (не повинно перевищувати 1%) [13], коефіцієнт симетрії піка L-аргініну, не повинен перевищувати 2,0. Для підтвердження придатності хроматографічної системи використовували стандартний розчин, який містить стандартний зразок L-аргініну

Оскільки піки динітрофторбензену та динітробензен похідного аргініну повністю розділяються хроматографічну колонку можна вважати придатною (рис. 2).

3.2. Вибір довжини хвилі детектування та оптимального температурного режиму.

Проаналізувавши літературні джерела [17, 21] детектування проводили при довжині хвилі 360 нм, що відповідає максимуму спектра поглинання динітробензен похідного аргініну.

Для вибору оптимального температурного режиму досліджували залежність тиску колонки від температури, проаналізувавши яку дійшли висновку, що температура, при якій найкраще проводити дослідження, рівна 40 ^{0}C.

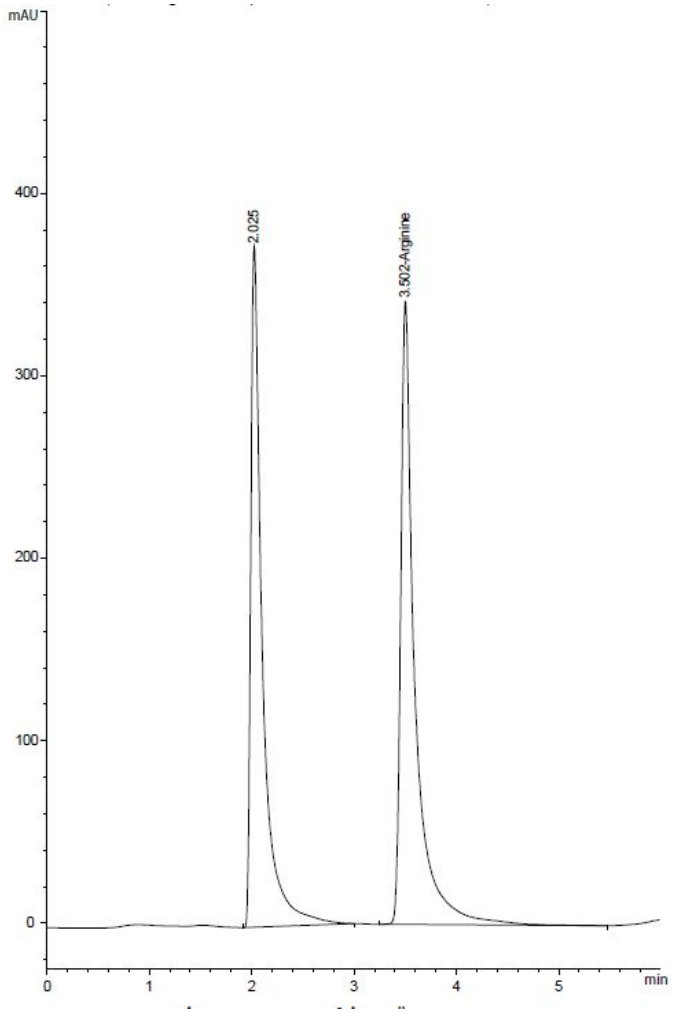


Рис. 2. Перевірка придатності хроматографічної системи

3.3. Калібрувальна (градуювальна) залежність площі піка від концентрації стандартного розчину L-аргініну. Визначення лінійності залежності.

Для побудови калібрувального графіку готували серію стандартних розчинів L-аргініну, які мали концентрацію 30, 40 та 50 мкг/мл розведенням попередньо приготованого розчину (стандартний розчин готували згідно п.2.1.6). Проводили хроматографічний аналіз проб та визначали площу піків. Вимірювання проводили не менше шести разів. Потім будували

градуювальну залежність площі піку від концентрації стандартного розчину. Результати вимірювань представлені в Таблиці 1 та на Рис. 3.

Таблиця 1. Побудова калібрувального графіка

x	**30 мкг/мл**	**40 мкг/мл**	**50 мкг/мл**
y_1	2106,77	2658,87	3216,23
y_2	2115,50	2745,22	3258,15
y_3	2012,32	2698,36	3129,99
y_4	2103,69	2622,14	3185,36
y_5	2096,25	2578,96	3085,96
y_6	2136,55	2601,32	3096,54
$\bar{y}$	2095,18	2650,81	3162,04

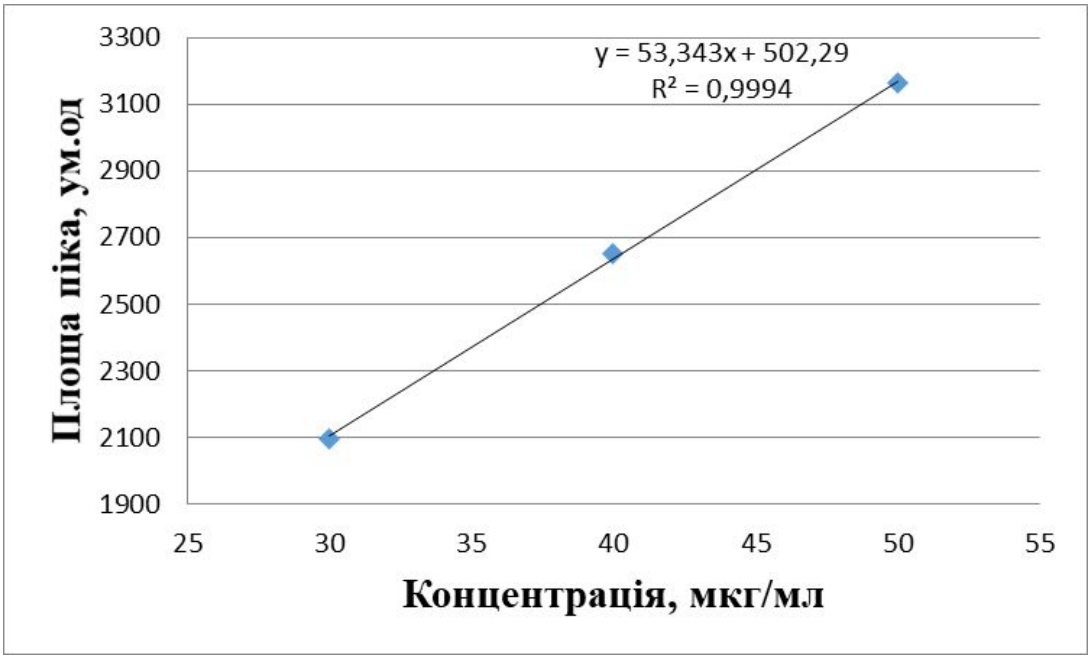


Рис. 3. Калібрувальний графік залежності площі піка від концентрації стандартних розчинів L-аргініну.

Провели статистичну оцінку параметрів лінійної залежності. Розрахували величину залишкової дисперсії, яка характеризує розкид значень y_i відносно Y_i

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - Y_i)^2}{v} = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_i^2 - a\cdot\sum_{i=1}^{n} y_i - b\cdot\sum_{i=1}^{n} x_i\cdot y_i}{v},\ v = n - 2.$$

$$s_0^2 = 328{,}56$$

Щоб рівняння $y = b\cdot x + a$ адекватно описувало експериментальні дані залишкова дисперсія s_0^2 не повинна значущо відрізнятися за критерієм Фішера від дисперсії відтворюваності (збіжності) величин y_i.

Розрахували також величину дисперсії констант a і b:

$$s_b^2 = \frac{n\cdot s_0^2}{n\cdot\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{n} x_i\right)^2},$$

$$s_b^2 = 1.6428$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{n}\cdot\sum_{i=1}^{n} x_i^2.$$

$$s_a^2 = 2738$$

Визначили стандартні відхилення s_b і s_a і напівширини довірчих інтервалів Δ_b і Δ_a, які потрібні для оцінки довірчих інтервалів констант:

$$s_b = \sqrt{s_b^2},$$

$$s_b = 1{,}28$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2},$$

$$s_a = 52{,}326$$

$$\Delta_b = t(P, v)\cdot s_b,\ v = n - 2,$$

$$t(0.95,2) = 4{,}3027$$

$$\Delta_b = 5{,}515$$

$$\Delta_a = t(P,v) \cdot s_a,\ v = n - 2.$$

$$\Delta_a = 225{,}33$$

Довірчі інтервали для констант *a* і *b* розраховували за рівняннями:

$$a \pm s_a \cdot t(P,v),$$
$$b \pm s_b \cdot t(P,v),$$

Отримали рівняння лінійної регресії: $y = 53{,}343x + 502{,}29$ ($y = bx+a$)

Довірчий інтервал для коефіцієнта *a*: 502,29 ± 225,33

Довірчий інтервал для коефіцієнта *b*: 53,343 ± 5,515

Коефіцієнт кореляції $R^2 = 0{,}9994$.

Отже, виконуються вимоги до лінійності і залежність площі піків від концентрації L-аргініну лінійна у даному діапазоні концентрацій.

3.4. Кількісне визначення L-аргініну у дієтичних добавках. Оцінка валідаційних характеристик.

Щоб результати кількісних визначень були точними та надійними, потрібно провести валідацію розробленої методики кількісного визначення L-аргініну в дієтичних добавках [22,23].

3.4.1. Оцінка специфічності методики.

Для підтвердження специфічності методики потрібно впевнитись у тому, що допоміжні речовини не впливають на методику. Для цього, в першу чергу, були отримані хроматограми розчину динітрофторбензену (Рис. 3) та випробуваного розчину (Рис. 4).

Крім того, методика кількісного визначення L-аргініну методом ВЕРХ була апробована на дієтичних добавках, які, крім L-аргініну, містять і допоміжні речовини, проте вони не заважали визначенню і за результатами дослідження вміст діючої речовини L-аргініну відповідає вказаному в інструкції до медичного застосування. Отже, методику можна вважати специфічною.

Результати кількісного визначення L-аргініну у досліджуваних зразках дієтичних добавок представлені у Таблицях 2 та 4.

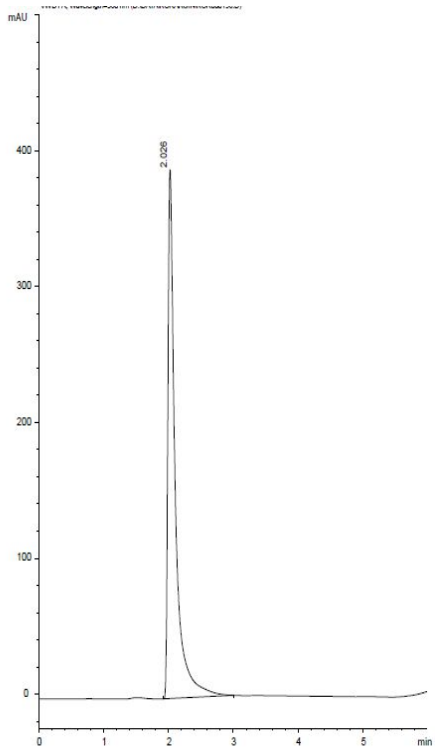


Рис. 3. Хроматограма розчину динітрофторбензену

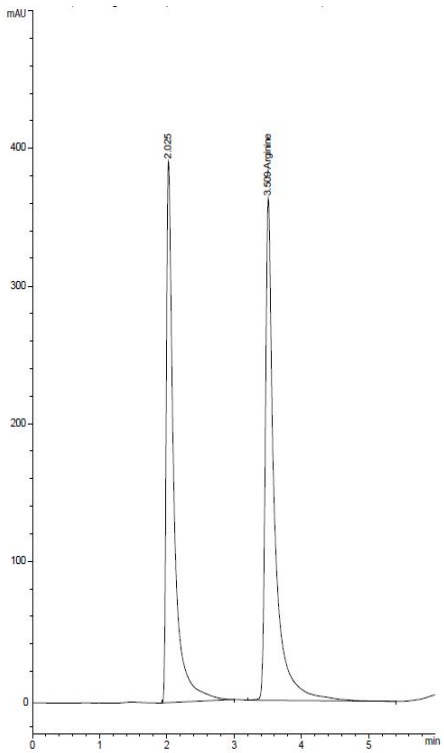


Рис. 4. Хроматограма випробуваного розчину

3.4.2. Прецизійність та робасність.

Прецизійність (близькість або розбіжність отриманих результатів методики) оцінювалась для серії визначень на різних пробах, але одного і того ж зразка [24]. Прецизійність обумовлюється випадковими похибками. Ми визначали прецизійність для нашої методики на рівні збіжності, для чого з трьох наважок готували три розчини, для кожного з яких проводили по три хроматографічних визначення та розраховували вміст L-аргініну в досліджуваних зразках.

Робасність методики оцінювали ще коли встановлювали оптимальні умови для проведення хроматографічного визначення L-аргініну та при аналізі досліджуваних зразків у різні дні, результати про що наведені в Таблицях 2 та 4.

Таблиця 2. Результати кількісного визначення L-аргініну у Зразку 1.

№ проби	Зразок 1, знайдено мг у дієтичній добавці, враховуючи розведення	
	День 1	День 2
1	349,56	348,98
2	351,03	349,09
3	349,71	350,61
4	350,12	349,76
5	350,35	350,74

Відповідно до інструкції до застосування Зразок 1 містить 350мг L-аргініну.

Розрахували метрологічні характеристики збіжності даної методики.

Спочатку обчислили середнє значення

$$\bar{x} \text{ (день 1)} = 350{,}15$$

$$\bar{x} \text{ (день 2)} = 349{,}84$$

Відносне стандартне відхилення (RSD) у відсотках визначали за формулою

$$RSD = s_r \cdot 100\%,$$

$s_r = \frac{s}{\bar{x}}$, s – стандартне відхилення

s (день 1) = 0,582

s (день 2) = 0,823

s_r (день 1) = 0,00166

s_r (день 2) = 0,00235

RSD (день 1) = 0,17%

RSD (день 2) = 0,24%

Оскільки *RSD* має значення менше 1% відтворюваність результатів вимірювання вважається хорошою,

Розрахували також дисперсію

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{\upsilon},$$

де υ – число ступенів свободи, n – обсяг вибірки, $\bar{x}$ – середнє значення, x_i – усі значення вибірки.

s^2 (день 1) = 0,339

s^2 (день 2) = 0,678

Визначили довірчий інтервал, який має вигляд для День 1:

$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}$ = 350,15 ± 0,72

і за його допомогою оцінюємо правильність отриманих результатів. Оскільки довірчий інтервал перебуває у межах від 349,43 до 350,87, а реальний вміст за інструкцією становить 350 мг, значення 350 мг потрапляє у знайдений довірчий інтервал, отже отримані результати можна вважати правильними, використаний метод не містить систематичної помилки.

Довірчий інтервал, для День 2:

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 349{,}84 \pm 1{,}02$$

І так само, довірчий інтервал перебуває у межах від 348,82 до 350,86, куди входить значення 350 мг, тому отримані результати можна вважати правильними, використаний метод не містить систематичної помилки

Відносна похибка середнього значення:

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta\bar{x}}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

$\bar{\varepsilon}$ (день 1) = 0,21%

$\bar{\varepsilon}$ (день 2) = 0,29%

Таблиця 3. Внутрішньолабораторна точність (Зразок 1):

	1 день аналізу	2 день аналізу
	349,56	348,98
	351,03	349,09
	349,71	350,61
	350,12	349,76
	350,35	350,74
Середнє значення	350,15	349,84
Об’єднане середнє	350,00	
Відносне стандартне відхилення (%)	0,20	
Коефіцієнт Стьюдента (95%, 9)	2,2622	
Відносний довірчий інтервал (%)	0,45	

Допустиме відхилення вмісту L-аргініну складає 2%, отже відносний довірчий інтервал 0,45 % доводить, що дана методика коректно працюватиме і в інших лабораторіях.

Таблиця 4. Результати кількісного визначення L-аргініну у Зразку 2.

№ проби	Зразок 2, знайдено мг у дієтичній добавці, враховуючи розведення	
	День 1	День 2
1	349,15	351,77
2	351,44	349,32
3	350,88	350,74
4	350,66	350,95
5	351,12	350,87

Відповідно до інструкції до застосування Зразок 1 містить 350мг L-аргініну.

Так само розрахували метрологічні характеристики збіжності даної методики для Зразка 2, отримали наступні значення:

- середнє значення

$\bar{x}$ (день 1) = 350,65

$\bar{x}$ (день 2) = 350,73

- RSD – відносне стандартне відхилення у відсотках

RSD (день 1) = 0,25%

RSD (день 2) = 0,25%

- дисперсія

s^2 (день 1) = 0,787

s^2 (день 2) = 0,784

- довірчий інтервал

$\Delta_{\bar{x}}$ (день 1) = 1,10

Довірчий інтервал має вигляд:

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 350{,}65 \pm 1{,}10$$

$$\Delta_{\bar{x}} \text{ (день 2)} = 1{,}10$$

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 350{,}73 \pm 1{,}10$$

Значення 350 мг входить у знайдений довірчий інтервал, тому отримані результати можна вважати правильними, даний метод не містить систематичної помилки

- відносна похибка середнього значення:

$$\bar{\varepsilon} \text{ (день 1)} = 0{,}31\%$$

$$\bar{\varepsilon} \text{ (день 2)} = 0{,}31\%$$

- внутрішньолабораторна точність:

Таблиця 5. Внутрішньолабораторна точність (Зразок 2):

	1 день аналізу	2 день аналізу
	349,15	351,77
	351,44	349,32
	350,88	350,74
	350,66	350,95
	351,12	350,87
Середнє значення	350,65	350,73
Об’єднане середнє	350,69	
Відносне стандартне відхилення (%)	0,32	
Коефіцієнт Стьюдента (95%, 9)	2,2622	
Відносний довірчий інтервал (%)	0,72	

Значення відносного довірчого інтервалу 0,72 % менше допустимого відхилення вмісту L-аргініну (2%), отже дана методика може використовуватись в інших лабораторіях.

3.4.3. Перевірка правильності методики.

Після того, як нами були оцінені прецизійність, лінійність, робасність і специфічність, ми можемо зробити висновок про правильність методики кількісного визначення L-аргініну в дієтичних добавках методом ВЕРХ. Правильність, яка характеризує близькість середнього результату значення, яке вимірюється, до істинного значення, у нашому випадку оцінювалась порівнянням отриманих результатів ВЕРХ визначення кількісного вмісту L-аргініну в досліджуваних зразках з його зазначеним у інструкції до застосування кількісним вмістом. Отже, дана методика є правильною.

3.5. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення L-аргініну.

Після аналізу літературних джерел та згідно ДФУ та Європейській фармакопеї L-аргінін кількісно визначають ацидиметричним методом, фіксуючи точку еквівалентності за допомогою індикатора метилового червоного розчину змішаного. Цей метод має ряд недоліків, наприклад, трудомісткість процесу, який включає стандартизацію робочого розчину хлоридної кислоти та його захист. Крім того він не є високоселективним, що ускладнює кількісне визначення L-аргініну в комбінованих препаратах. Титриметричний аналіз до того ж має багато джерел помилок титрування. Це і похибка вимірювання об’ємів, і не достатньо різка зміна кольору індикатора поблизу точки еквівалентності, і відхилення показника титрування індикатора від pH точки еквівалентності.

Високоефективна рідинна хроматографія дає змогу провести точні дослідження, які вирізняються високою селективністю та швидкістю. Цей метод володіє високою роздільною здатністю, що дає змогу кількісно визначати будь-який компонент у багатокомпонентному препараті. До того ж

метод дуже чутливий і має гарну відтворюваність. Процес може бути автоматизований, що спрощує обробку результатів дослідження. Тому метод високоефективної рідинної хроматографії може використовуватись як альтернативний та перспективний метод для кількісного визначення L-аргініну в дієтичних добавках.

ВИСНОВКИ

- Проаналізовано літературні дані щодо застосування L-аргініну в медицині та фармації, його фізико-хімічні властивості, механізм дії та метаболізм L-аргініну.
- Проаналізовано відомі методики кількісного визначення L-аргініну: згідно ДФУ та Європейської фармакопеї (ацидиметричне титрування), спектрофотометричне визначення, метод тонкошарової хроматографія, газорідинної хроматографії, метод ВЕРХ з попередньою дериватизацією L-аргініну.
- На основі проведених досліджень була запропонована методика кількісного визначення L-аргініну у дієтичних добавках, яка дозволяє прискорити процес визначення L-аргініну та має більш високу селективність та точність.
- Проведено часткову валідацію запропонованої методики кількісного визначення L-аргініну в дієтичних добавках методом ВЕРХ за лінійністю, прецизійністю (збіжністю), специфічністю, робасністю та правильністю, з оцінки яких слідує, що дану методику можна використовувати для кількісного визначення L-аргініну в дієтичних добавках.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Wu G., Mtininger C. J. Arginine Nutriation and Cardiovascular Function. *Journal of Nutrition,* 2 000, v ol. 1 30, pp. 2626–2629. https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2626

2. Катеринчук, И. П. Кардиальные эффекты аргинина и эффективность кардиоаргинина при сердечно-сосудистой патологии. *Здоров'я України.* 2012, № 9, С. 76.

3. Guoyao Wuab, Laurie A Jaegerb, Fuller W Bazerb, J.Marc Rhoadsc *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 2004, 15(8) : 442-451.

4. Hurt R.T., Ebbert J.O., Schroeder D.R., Croghan I.T., Bauer B.A., McClave S.A., Miles J.M., McClain C.J. L-Arginine for the treatment of centrally obese subjects: a pilot study. J. Dietary Supplem. 2014. V. 11. N 1. P. 40-52. DOI: 10.3109/19390211.2013.859216

5. Boger R.H. The pharmacodynamics of L-Arginine. J. Nutrition. 2007. V. 137. P. 1650-1655. DOI: 10.1093/jn/137.6.1650S.

6. М.Я. Юзьків [та ін.]. Кардіопротективна роль L-аргініну. *Буковин. мед. вісн.* - 2003. - Т. 7, № 1/2. - С. 173-177.

7. В.Ф. Сагач, О.Д. Присяжна, М.М. Ткаченко, А.В. Коцюруба. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету. *Фізіол. журн.* 2005, Т. 51, № 2, с. 3-7.

8. В.Г. Граник . Метаболизм L-аргинина (обзор). *Химико-фармацевт. ж.*, 2003, Т. 37,. № 3.

9. Natural composition for the treatment of circularly conditions: Пат. 6340480 США, МПК[7] А61 К 35/78 / Duckett Melvin J., Moore Kyle

10. Hsiao G. Protective mechanisms of inosine in platelet activation and cerebral ischemic damage / G. Hsiao, Kuang H. Lin., Y. Chang [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2005. – V. 25. – P. 1998-2004.

11. Вікіпедія. Режим доступу: https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D1%80%D0%B3%D1%96%D0%BD%D1%96%D0%BD

12. Аргінін. Велика українська енциклопедія. URL: https://vue.gov.ua/Аргінін

13. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків, 2015. в 3 т. Т.1. 1128 с.

14. Г. З. Гайда, Н. Є. Стасюк, М. В. Гончар. Методи аналізу L-аргініну. *Biotechnologia Acta.* 2014, Vol. 7, № 1., с. 31-39. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2014_7_1_4

15. Електронний резурс. Режим доступу: https://belok.ua/blog/ua/arginin-chto-eto/

16. Дей, Р., Андервуд, А. (1989). *Кількісна аналітична хімія*. (п'яте видання). PEARSON Prentice Hall.

17. М. В. Росада, Н. Ю. Бевз, В. А. Георгіянц. Використання методу високоефективної рідинної хроматографії для кількісної оцінки L-аргініну у комбінованих таблетках. *Фармаком.* 2018, № 2, с. 36-44.

18. Електронний резурс. Режим доступу: https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php/359469/mod_resource/content/2/Papka%201%20Amynokisloty%202020.pdf

19. Електронний резурс. Режим доступу: https://tabletki.ua/%D0%9B-%D0%B0%D1%80%D0%B3%D0%B8%D0%BD%D0%B8%D0%BD/1028245/

20. Електронний резурс. Режим доступу: https://tabletki.ua/PALIANYTSIA/filter/ct=1403/

21. Ромась К.П., О.І. Тихонов. Кількісне визначення аргініну у капсулах «Апінін» методом високоефективної рідинної хроматографії. *Вісник фармації.* 2011., Вип. 2, № 66, С. 37–40.

22. 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.

23. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.

24. Електронний ресурс. Режим доступу: https://www.slideshare.net/anna_chem/ss-47510120

25. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. *Аналитическое обеспечение создания, стандартизации и контроля качества лекарственных средств*. Харьков, НТМТ., Т.1, 2011, с. 934-1063.

ДОДАТКИ

Додаток 1.

Витяг з Європейської Фармакопеї

TESTS

Acid value (*2.5.1*): maximum 0.5, determined on 10.0 g.

Peroxide value (*2.5.5, Method A*): maximum 5.0.

Unsaponifiable matter (*2.5.7*): maximum 1.0 per cent, determined on 5.0 g.

Alkaline impurities (*2.4.19*). It complies with the test.

Composition of fatty acids. (*2.4.22, Method A*). Use the mixture of calibrating substances in Table 2.4.22.-3.

Composition of the fatty-acid fraction of the oil:

- *saturated fatty acids of chain length less than* C_{16}: maximum 0.4 per cent;
- *palmitic acid*: 5.0 per cent to 14.0 per cent;
- *stearic acid*: 1.3 per cent to 6.5 per cent;
- *oleic acid*: 35.0 per cent to 72.0 per cent;
- *linoleic acid*: 12.0 per cent to 43.0 per cent;
- *linolenic acid*: maximum 0.6 per cent;
- *arachidic acid*: 0.5 per cent to 3.0 per cent;
- *eicosenoic acid*: 0.5 per cent to 3.0 per cent;
- *behenic acid*: 1.0 per cent to 5.0 per cent;
- *erucic acid*: maximum 0.5 per cent;
- *lignoceric acid*: 0.5 per cent to 3.0 per cent.

Water (*2.5.32*): maximum 0.1 per cent, determined on 1.00 g.

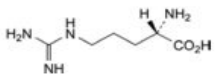
STORAGE

In a well-filled container, protected from light.

01/2008:0806
corrected 6.0

ARGININE

Argininum



$C_6H_{14}N_4O_2$ M_r 174.2
[74-79-3]

DEFINITION

Arginine contains not less than 98.5 per cent and not more than the equivalent of 101.0 per cent of (*S*)-2-amino-5-guanidinopentanoic acid, calculated with reference to the dried substance.

CHARACTERS

A white or almost white, crystalline powder or colourless crystals, freely soluble in water, very slightly soluble in alcohol.

IDENTIFICATION

First identification: A, C.

Second identification: A, B, D, E.

A. Specific optical rotation (see Tests).

B. Solution S (see Tests) is strongly alkaline (*2.2.4*).

C. Examine by infrared absorption spectrophotometry (*2.2.24*), comparing with the spectrum obtained with *arginine CRS*. Examine the substances prepared as discs.

D. 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).

E. Dissolve about 25 mg in 2 mL of *water R*. Add 1 mL of *α-naphthol solution R* and 2 mL of a mixture of equal volumes of *strong sodium hypochlorite solution R* and water. A red colour develops.

TESTS

Solution S. Dissolve 2.5 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 not more intensely coloured than reference solution BY_6 (*2.2.2, Method II*).

Specific optical rotation (*2.2.7*). Dissolve 2.00 g in *hydrochloric acid R1* and dilute to 25.0 mL with the same acid. The specific optical rotation is + 25.5 to + 28.5, 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 *dilute hydrochloric acid R* and dilute to 10 mL with the same acid.

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

Reference solution (a). Dissolve 10 mg of *arginine CRS* in *0.1 M hydrochloric acid* and dilute to 50 mL with the same acid.

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

Reference solution (c). Dissolve 10 mg of *arginine CRS* and 10 mg of *lysine hydrochloride CRS* in *0.1 M hydrochloric acid* and dilute to 25 mL with the same acid.

Apply to the plate 5 µL of each solution. Allow the plate to dry in air. Develop over a path of 15 cm using a mixture of 30 volumes of *concentrated ammonia R* and 70 volumes of *2-propanol R*. Dry the plate at 100 °C to 105 °C until the ammonia disappears completely. Spray with *ninhydrin solution R* and heat at 100 °C to 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 two clearly separated spots.

Chlorides (*2.4.4*). To 5 mL of solution S add 0.5 mL of *dilute nitric acid R* and dilute to 15 mL with *water R*. The solution complies with the limit test for chlorides (200 ppm).

Sulfates (*2.4.13*). To 10 mL of solution S, add 1.7 mL of *dilute hydrochloric acid R* and dilute 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* NH_4*) R*.

Iron (*2.4.9*). In a separating funnel, dissolve 1.0 g in 10 mL of *dilute hydrochloric acid R*. Shake with three 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).

Heavy metals (*2.4.8*). Dissolve 2.0 g in *water R* and dilute to 20 mL with the same solvent. 12 mL of the solution complies with test A for heavy metals (10 ppm). Prepare the reference solution using *lead standard solution (1 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 0.150 g in 50 mL of *water R*. Using 0.2 mL of *methyl red mixed solution R* as indicator, titrate with *0.1 M hydrochloric acid* until the colour changes from green to violet-red.

1 mL of *0.1 M hydrochloric acid* is equivalent to 17.42 mg of $C_6H_{14}N_4O_2$.

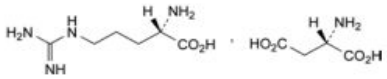
STORAGE

Store protected from light.

01/2008:2096
corrected 6.0

ARGININE ASPARTATE

Arginini aspartas



$C_{10}H_{21}N_5O_6$ M_r 307.3
[7675-83-4]

DEFINITION

(2*S*)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid (2*S*)-2-aminobutanedioate.

Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white granules or powder.

Solubility: very soluble in water, practically insoluble in alcohol and in methylene chloride.

IDENTIFICATION

A. Specific optical rotation (see Tests).

B. Infrared absorption spectrophotometry (*2.2.24*).
Comparison: *arginine aspartate CRS*.

C. Examine the chromatograms obtained in the test for ninhydrin-positive substances.
Results: the 2 principal spots in the chromatogram obtained with test solution (b) are similar in position, colour and size to the 2 principal spots in the chromatogram obtained with reference solution (a).

TESTS

Solution S. Dissolve 5.0 g in *carbon dioxide-free water R* and dilute to 50 mL with the same solvent.

Appearance of solution. Solution S is clear (*2.2.1*) and not more intensely coloured than reference solution Y_7 (*2.2.2, Method II*).

pH (*2.2.3*): 6.0 to 7.0 for solution S.

Specific optical rotation (*2.2.7*): + 25 to + 27 (dried substance).

Dissolve 2.50 g in *dilute hydrochloric acid R* and dilute to 25.0 mL with the same acid.

Ninhydrin-positive substances. Thin-layer chromatography (*2.2.27*).

Test solution (a). Dissolve 0.20 g of the substance to be examined in *water R* and dilute to 10 mL with the same solvent.

Test solution (b). Dilute 1 mL of test solution (a) to 10 mL with *water R*.

Reference solution (a). Dissolve 25 mg of *arginine R* and 25 mg of *aspartic acid R* in *water R* and dilute to 25 mL with the same solvent.

Reference solution (b). Dilute 2 mL of reference solution (a) to 50 mL with *water R*.

Plate: *TLC silica gel G plate R*.

Mobile phase: *ammonia R, propanol R* (36:64 *V/V*).

Application: 5 µL.

Development: over 2/3 of the plate.

Drying: at 100-105 °C for 10 min.

Detection: spray with *ninhydrin solution R* and heat at 100-105 °C for 10 min.

System suitability: reference solution (b):
– the chromatogram shows 2 clearly separated principal spots.

Limit: test solution (a):
– *any impurity*: any spots, apart from the 2 principal spots, are not more intense than each of the 2 principal spots in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.2 per cent).

Chlorides (*2.4.4*): maximum 200 ppm.

Dilute 2.5 mL of solution S to 15 mL with *water R*.

Sulfates (*2.4.13*): maximum 300 ppm.

To 0.5 g add 2.5 mL of *dilute hydrochloric acid R* and dilute to 15 mL with *distilled water R*. Examine after 30 min.

Ammonium (*2.4.1*): maximum 100 ppm, determined on 100 mg.

Heavy metals (*2.4.8*): maximum 20 ppm.

12 mL of solution S complies with test A. Prepare the reference solution using *lead standard solution (2 ppm Pb) R*.

Loss on drying (*2.2.32*): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 60 °C for 24 h.

Sulfated ash (*2.4.14*): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

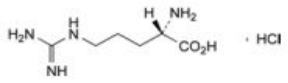
Dissolve 80.0 mg in 2 mL of *anhydrous formic acid R*. Add 50 mL of *anhydrous acetic acid R*. Titrate with *0.1 M perchloric acid*, determining the end-point potentiometrically (*2.2.20*).

1 mL of *0.1 M perchloric acid* is equivalent to 10.24 mg of $C_{10}H_{21}N_5O_6$.

01/2008:0805
corrected 6.0

ARGININE HYDROCHLORIDE

Arginini hydrochloridum



$C_6H_{15}ClN_4O_2$ M_r 210.7
[1119-34-2]

DEFINITION

Arginine hydrochloride contains not less than 98.5 per cent and not more than the equivalent of 101.0 per cent of the hydrochloride of (*S*)-2-amino-5-guanidinopentanoic acid, calculated with reference to the dried substance.

CHARACTERS

A white or almost white, crystalline powder or colourless crystals, freely soluble in water, very slightly soluble in alcohol.

IDENTIFICATION

First identification: *A, B, E.*

Second identification: *A, C, D, E.*

A. Specific optical rotation (see Tests).

Додаток 2.

Витяг з Державної фармакопеї України

Аргінін

Лужні домішки (*2.4.19*). Субстанція має витримувати випробування на лужні домішки у жирних оліях.

Жирнокислотний склад (*2.4.22, метод А*). Використовують суміші речовин, застосовуваних для калібрування (Таблиця 2.4.22.-3).

Склад фракції жирних кислот має бути таким:
— *насичені жирні кислоти з довжиною ланцюга менше* C_{16}: не більше 0.4 %,
— *пальмітинова кислота*: від 5.0 % до 14.0 %,
— ід 1.3 % до 6.5 %,
— 5.0 % до 72.0 %,
— 2.0 % до 43.0 %,
— більше 0.6 %,
—
—
— ,
— *ерукова кислота*: не більше 0.5 %,
— *лігноцеринова кислота*: від 0.5 % до 3.0 %.

Вода (*2.5.32*). Не більше 0.1. Визначення проводять з 1.00 г субстанції.

ЗБЕРІГАННЯ

У максимально наповненому контейнері, у захищеному від світла місці.

АРГІНІН

Arginінum

ARGININE

$C_6H_{14}N_4O_2$ М.м. 174.2
[74-79-3]

Аргінін містить не менше 98.5 % і не більше 101.0 % (*S*)-2-аміно-5-гуанідинопентанової кислоти, у перерахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору або безбарвні кристали.

Розчинність. Легко розчинний у *воді Р*, дуже мало розчинний в *етанолі (96 %) Р*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: A, C.
Друга ідентифікація: A, B, D, E.

A. Субстанція має відповідати вимогам щодо питомого оптичного обертання як зазначено в розділі «Випробування».

B. Розчин S, приготований як зазначено в розділі «Випробування», повинен мати сильнолужну реакцію (*2.2.4*).

C. Інфрачервоний спектр (*2.2.24*) субстанції, одержаний у дисках, має відповідати спектру *ФСЗ аргініну*.

D. На хроматограмі випробовуваного розчину (b), одержаній у випробуванні «Речовини, виявлювані нінгідрином», має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром і забарвленням.

E. Близько 25 мг субстанції розчиняють у 2 мл *води Р*. Додають 1 мл розчину *α-нафтолу Р* та 2 мл суміші рівних об'ємів *натрію гіпохлориту розчину концентрованого Р* і *води Р*; з'являється червоне забарвлення.

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 2.5 г субстанції розчиняють у *воді дистильованій Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл.

Прозорість розчину (*2.2.1*). Розчин S має бути прозорим.

Кольоровість розчину (*2.2.2, метод II*). Забарвлення розчину S має бути не інтенсивнішим за еталон BY_6.

Питоме оптичне обертання (*2.2.7*). Від +25.5 до +28.5, у перерахунку на суху речовину. 2.00 г субстанції розчиняють у *хлористоводневій кислоті Р1* і доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 25.0 мл.

Речовини, виявлювані нінгідрином. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (*2.2.27*), використовуючи *ТШХ пластинки із шаром силікагелю Р*.

Випробовуваний розчин (a). 0.10 г субстанції розчиняють у *хлористоводневій кислоті розведеній Р* і доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 10 мл.

Випробовуваний розчин (b). 1 мл випробовуваного розчину (a) доводять *водою Р* до об'єму 50 мл.

Розчин порівняння (a). 10 мг *ФСЗ аргініну* розчиняють у *0.1 М розчині хлористоводневої кислоти* та доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 50 мл.

Розчин порівняння (b). 5 мл випробовуваного розчину (b) доводять *водою Р* до об'єму 20 мл.

мг *ФСЗ аргініну* та 10 мг
озчиняють у *0.1 М розчині*
та доводять об'єм розчину
тією самою кислотою до 25 мл.

На лінію старту хроматографічної пластинки наносять по 5 мкл кожного розчину, сушать на повіт-

105 °С протягом 15 хв.

На хроматограмі випробовув
яка пляма, крім основної, н
шою за пляму на хроматогр
ня (b) (0.5 %).

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо на хроматограмі розчину порівняння (c) виявляються дві чітко розділені плями.

Хлориди (*2.4.4*). Не більше 0.02 % (200 ppm).

До 5 мл розчину S додають 0.5 мл *азотної кислоти розведеної Р* і доводять *водою Р* до об'єму 15 мл.

Сульфати (*2.4.13*). Не більше 0.03 % (300 ppm).

До 10 мл розчину S додають 1.7 мл *хлористоводневої кислоти розведеної Р* і доводять *водою дистильованою Р* до об'єму 15 мл.

Амонію солі (*2.4.1, метод В*). Не більше 0.02 % (200 ppm). 50 мг субстанції мають витримувати випробування на амонію солі. Еталон готують із використанням 0.1 мл *амонію еталонного розчину (100 ppm NH_4) Р.*

Залізо (*2.4.9*). Не більше 0.001 % (10 ppm).

органічних шарів додають 10 мл *води Р* і струшують протягом 3 хв. Одержаний водний шар має витримувати випробування на залізо.

Важкі метали (*2.4.8, метод А*). Не більше 0.001 % (10 ppm).

2.0 г об'єм
розч 12 мл
одер робу-

вання на важкі метали. Еталон готують із використанням *свинцю еталонного розчину (1 ppm Pb) Р.*

Втрата в масі при висушуванні (*2.2.32*). Не більше 0.5 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 °С.

Сульфатна зола (*2.4.14*). Не більше 0.1 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.150 г субстанції розчиняють у 50 мл *води Р* і титрують *0.1 М розчином хлористоводневої кислоти* до переходу забарвлення від зеленого до фіолетово-червоного, використовуючи як індикатор 0.2 мл *метилового червоного розчину змішаного Р.*

1 мл *0.1 М розчину хлористоводневої кислоти* відповідає 17.42 мг $C_6H_{14}N_4O_2$.

ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

АРГІНІНУ ГІДРОХЛОРИД

Arginini hydrochloridum

ARGININE HYDROCHLORIDE

$C_6H_{15}ClN_4O_2$ **М.м. 210.7**
[1119-34-2]

Аргініну гідрохлорид містить не менше 98.5 % і не більше 101.0 % гідрохлориду (*S*)-2-аміно-5-гуанідинопентанової кислоти, у перерахунку на суху речовину.

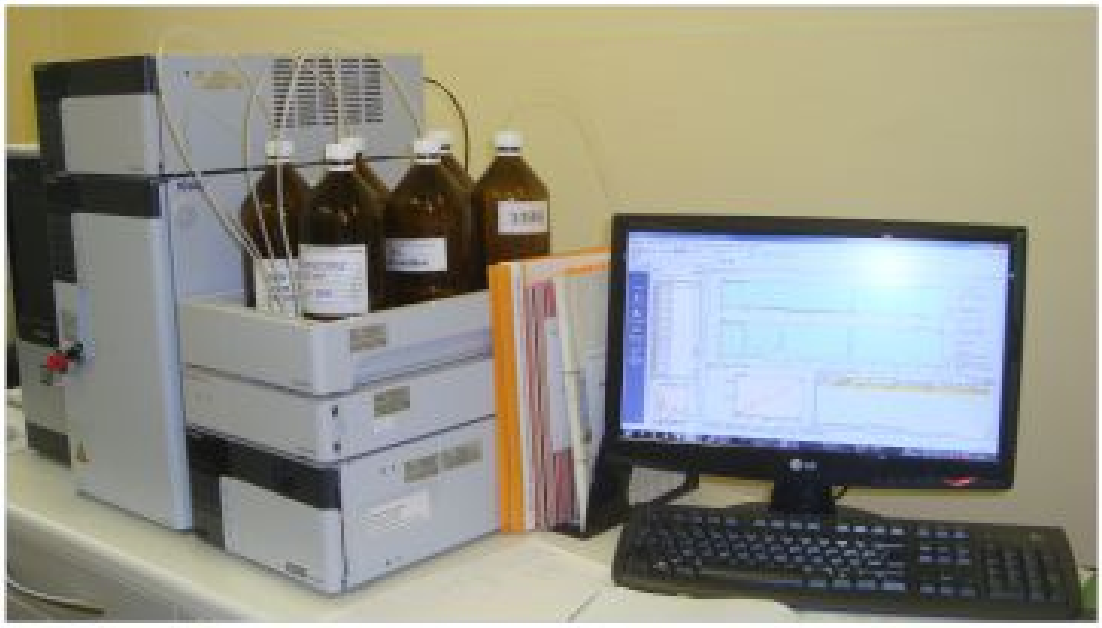
ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору або безбарвні кристали.

Розчинність. Легко розчинний у *воді Р*, дуже мало розчинний в *етанолі* (96 %) *Р.*

Додаток 3.

Хроматограф рідинний Shimadzu LC-10ADvp, зав. № C20964330924CS, свідоцтво про калібрування № 3991 від 05.07.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ СЕРВІС».



Додаток 4.

Сертифікат учасника конференції.

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

СЕРТИФІКАТ № 2023-1101- 5508998-100131

ЦИМ ПОСВІДЧУЄТЬСЯ, ЩО

ЯРМАК Г.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

Hanna Yarmak

Topic: «Quantitative determination of L-arginine in dietary supplements by high-performance liquid chromatography»

Department of analytical, physical and colloid chemistry

Scientific supervisor: Oksana Chkhalo

Keywords: high-performance liquid chromatography, L-arginine, dietary supplements.

Introduction. L-arginine, a conditionally essential α-amino acid, has a wide range of pharmacological effects, primarily being one of the main sources of nitric oxide in the body, which is necessary to ensure the maintenance of adequate coronary blood flow. That is why doctors prescribe it for heart failure, myocardial infarction and other diseases associated with blood circulation disorders. L-arginine is included in formulations, in addition to cardiac drugs, also hepatoprotectors, immunomodulators, drugs for the treatment of patients with burns and diabetes mellitus. L-arginine is also used by athletes as a dietary supplement to improve endurance and recover from injuries. The composition of dietary supplements does not always correspond to that indicated on the package, so the current task of analysts is to develop modern and accurate methods for the quantitative determination of arginine in dietary supplements.

The aim of the study is to develop a method for the quantitative determination of arginine in dietary supplements by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Research methods. High performance liquid chromatography.

Results. In accordance with the SPS and the European Pharmacopoeia, L-arginine is determined by the acid-base titration method with a solution of hydrochloric acid. A mixed methyl red solution is used as an indicator. Other methods for the quantitative determination of L-arginine are also known: spectrophotometric, polarographic, fluorometric methods, ion-exchange chromatography, HPLC, and enzymatic methods. For the quantitative

determination of L-arginine in dietary supplements, we chose the high-performance liquid chromatography method because of its speed, high accuracy, and selectivity. A mixture of ammonium acetate and acetonitrile solutions was used as the mobile phase, and a solution of the arginine standard sample was used as the reference solution. The test solution was prepared by dissolving the tablets (open capsules) of samples 1 and 2 in hydrochloric acid, followed by filtration through a membrane filter. A solution of sodium tetraborate and dinitrofluorobenzene was added to a portion of the diluted solution and kept in a water bath for 45 minutes at a temperature of about 85 °C, and then the solution was cooled. According to the instructions for the samples of dietary supplements taken for analysis, the L-arginine content in them is 350 mg. Chromatography was performed on a Shimadzu LC-10ADvp liquid chromatograph with a Nova-Pak C18 150×3.9 mm column with spectrophotometric detection at 360 nm. The amount of L-arginine in the test samples was determined by a calibration graph of the dependence of the area of arginine peaks on its content in a series of standard solutions. Based on the results of the study, we conclude that the found L-arginine content in dietary supplements corresponds to that indicated in the instructions for use. Thus, the found L-arginine content in dietary supplements corresponds to that indicated in the instructions for use.

Conclusions. As a result of the study, a method for the quantitative determination of L-arginine in dietary supplements was developed and tested.