

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Фармацевтичний факультет

Спеціальність – 226 «Фармація, промислова фармація»

Кафедра аналітичної, фізичної та колоїдної хімії

Допущено до захисту
Протокол засідання
кафедри
№ _____ від
“ _____ ” 2023р.

Завідувачка кафедри
аналітичної, фізичної та
колоїдної хімії

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**Кількісне визначення гліцину у сублінгвальних таблетках
спектрофотометричним методом.**

Виконала: студентка 5-го курсу, групи
М1Б фармацевтичного факультету

Павлюк Марія Миколаївна

Науковий керівник:

Доцент кафедри аналітичної,
фізичної та колоїдної хімії, кандидат
педагогічних наук,

Чхало Оксана Миколаївна

Київ – 2024

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
Основна частина. Розділ 1. Гліцин, методи визначення.	7
1.1. Застосування гліцину.	7
1.2. Фізико-хімічні властивості гліцину.	7
1.3. Механізм дії та метаболізм гліцину.	8
1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування гліцину.	8
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення гліцину.	11
1.6. Сполука 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон як реагент у фотометричних методах дослідження.	11
Розділ 2. Експериментальна частина.	13
2.1. Матеріали та методи.	13
2.1.1. Мета дослідження.	13
2.1.2. Об'єкти дослідження.	13
2.1.3. Посуд та обладнання.	15
2.1.4. Реактиви.	15
2.2. Приготування розчинів.	15
2.2.1. Приготування 1,0 % розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону.	15
2.2.2. Приготування стандартного розчину гліцину.	15
2.2.3. Приготування аналізованого розчину гліцину.	16
2.3. Спектрофотометричне визначення гліцину, який входить до складу сублінгвальних таблеток.	16
2.4. Розрахунок вмісту гліцину в аналізованому розчині.	16
Розділ 3. Результати та обговорення.	17
3.1. Аналіз нагрівання реакційної суміші.	18

3.2. Аналіз залежності оптичної густини A від довжини хвилі λ (побудова спектра поглинання).	19
3.3. Перевірка лінійності методики.	20
3.4. Визначення стабільності розчину продукту гліцину з 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону у часі.	22
3.5. Кількісне визначення гліцину у сублінгвальних таблетках.	23
3.6. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення гліцину у різноманітних лікарських засобах, дієтичних добавках та субстанції.	26
Висновки.	27
Список використаних джерел.	28
Додатки.	30
Анотація (Summary).	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВЕРХ – вискоєфективна рідинна хроматографія

РХ – рідинна хроматографія

ТШХ -тонкошарова хроматографія

ЦНС – центральна нервова система

ДФУ - державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

ТЛФ – тверда лікарська форма

ДМФА - диметилформамід

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

ІЧ, УФ спектр – інфрачервоний, ультрафіолетовий спектр поглинання

мкг – мікрограм

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

С⁰ – градуси Цельсія

ВСТУП

Амінокислотами називають похідні карбонових кислот, у яких один або декілька атомів гідрогену заміщується на аміногрупу[1]. У живих організмах амінокислоти можуть перебувати або у вільному вигляді, або у складі білків. Існує майже 300 амінокислот, але тільки 20 з них входять до складу ДНК і всі вони виключно відносяться до α -амінокислот[1].

Класифікують амінокислоти за структурою (будовою радикалу), за кислотно-основними властивостями та фізіологічною роллю.

У медицині та фармації широко використовують як амінокислоти, так і їх похідні, продукти обміну амінокислот, солі амінокислот (наприклад, аспарагінової кислоти)[2].

Першим і найпростішим представником α -амінокислот є α -аміноетанова кислота, або гліцин.

Препарати, до складу яких входить гліцин, ефективні при серцево-судинних хворобах, неврологічних та ендокринних патологіях[2].

Актуальність теми: Необхідність постійного пошуку нових методик кількісного визначення амінокислот у лікарських засобах або дієтичних добавках.

Мета: розробити та апробувати нову методику кількісного спектрофотометричного визначення амінокислоти гліцин у сублінгвальних таблетках.

Завдання:

1. Проаналізувати фізико-хімічні властивості амінокислоти гліцин. Визначити терапевтичну та фармакологічну дію, метаболізм та побічну дію.
2. Провести бібліосемантичний аналіз щодо ідентифікації та кількісного визначення гліцину у субстанції, лікарських засобах та дієтичних добавках.
3. Розробити нову методику спектрофотометричного кількісного визначення гліцину в об'єктах дослідження та провести часткову валідацію методики згідно з вимогами ДФУ.

Методи дослідження: Бібліосемантичний, спектрофотометричний методи.

Новизна та значення одержаних результатів: розробка нової методики кількісного визначення гліцину у сублінгвальних таблетках.

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.

Структура роботи. Робота представлена на 40 сторінках, додатків -4, рисунків- 5, таблиць- 1.

ОСНОВНА ЧАСТИНА.

Розділ 1. Гліцин, методи визначення.

1.1 Застосування гліцину.

В організмі у центральній нервовій системі гліцин проявляє себе як нейротрансмітер оскільки має низку захисних ефектів, діє на запальні клітини і пригнічує активацію факторів транскрипції, покращує якість сну і одночасно зменшує денну сонливість. Гліцин кон'югує жовчні кислоти, сприяє абсорбції певних вітамінів та жирів[2].

Гліцин позитивно впливає на стан шкіри оскільки є компонентом колагену, позитивно впливає на матрикс шкіри, відновлює її, сприяє збільшенню вмісту проколагену I типу та еластину[3-10].

Прийом гліцину сприяє регенерації хрящів, тобто ця амінокислота має велику роль у профілактиці артритів.

Гліцин застосовують для запобігання атрофії м'язів, яка може виникнути у пацієнтів похилого віку, при певних хронічних захворюваннях, сепсисі та травмах.

Терапевтичний прийом гліцину знижує ризик інфаркту міокарду у хворих з діагностованою стенокардією.

При хімічних взаємодіях завдяки присутності групи $-NH_2$ гліцин може вступати у реакції комплексоутворення і проявляти властивості донора електронної густини, тобто бути лігандом.

Призначають гліцин також при алкогольної інтоксикації оскільки ця амінокислота є ефективною для захисту печінки оскільки зменшує негативний вплив ацетальдегіду (продукт метаболізму етилового спирту)[3-10].

1.2. Фізико-хімічні властивості гліцину.

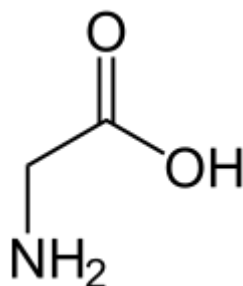


Рис. 1. Гліцин.

За IUPAC сполука має назву 2 - аміноетанова кислота.

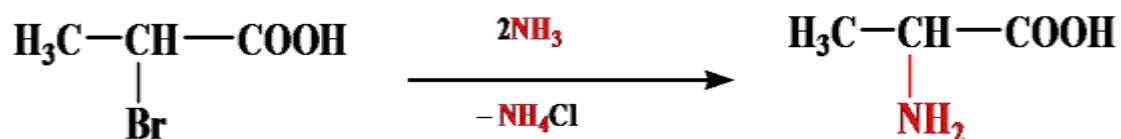
Міжнародна назва Glycinum.

Брутто формула: $C_2H_5NO_2$.

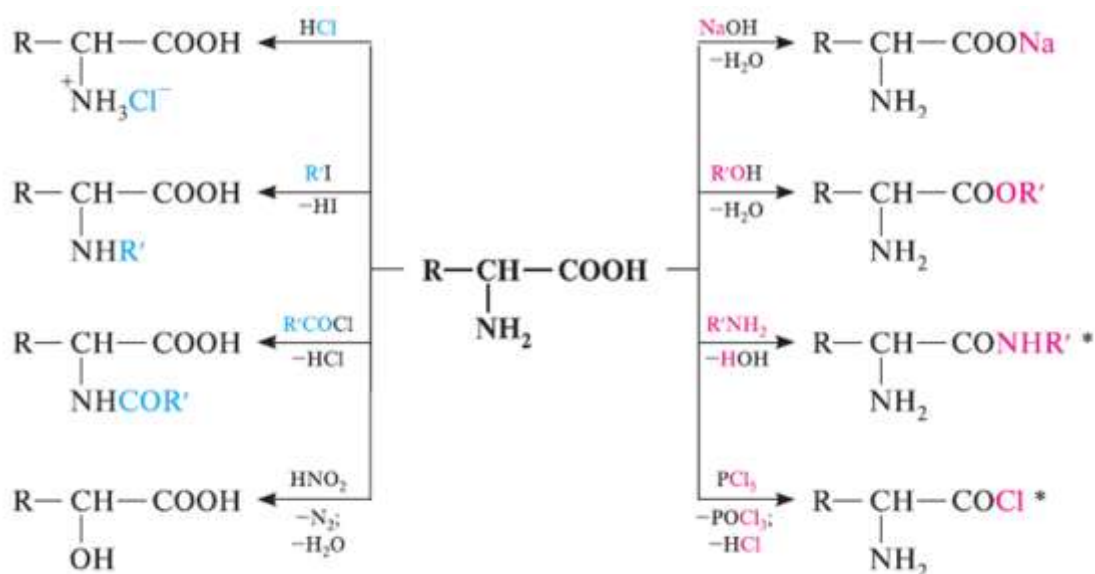
Молекулярна маса становить 75,1 г/моль[11].

За агрегатним станом це кристалічна біла речовина, добре розчиняється у воді, малорозчинна або майже нерозчинна в органічних розчинниках. Температура плавлення $T_{пл}$ — 232–236 °С. Зберігають гліцин у хімічному посуді без доступу повітря[11].

Синтез гліцину схематично може бути представлений так:

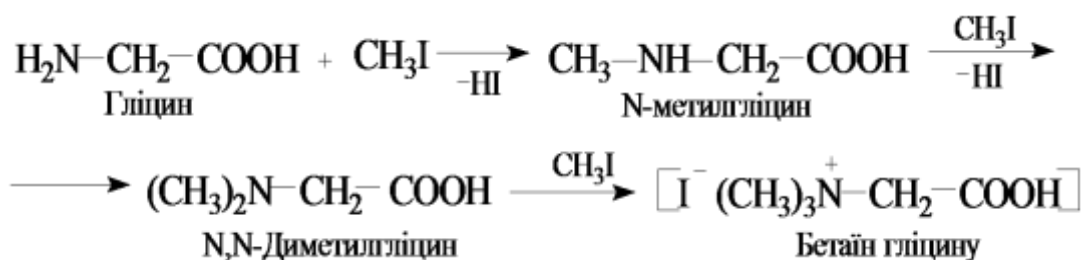


Хімічні властивості гліцину можуть бути описані загальною схемою для всіх α -амінокислот оскільки у хімічному плані взаємодія може відбуватися по аміно- або карбоксі- функціональним групам [12]:



* Реакції проводять після попереднього захисту аміногрупи.

З алкілюючими реагентами реакція відбувається за схемою:



1.3. Механізм дії та метаболізм гліцину.

Загалом, вплив гліцину на організм оцінюється як позитивний. За допомогою гліцину у ЦНС відбувається перенос електричного імпульсу з нервових клітин через синаптичний простір. Гліцин виконує величезну кількість функцій у нервових та периферичних тканинах (протизапальну, антиоксидантну, кріозахисну, імуномодулюючу).

У біологічних рідинах та тканинах гліцин може бути у вільному стані, але найчастіше є складовою антибіотиків, нейропептидів, муреїну, і,

відповідно, може приймати участь у синтезі замінних амінокислот, креатину, пурину тощо. Є метаболічним препаратом[3].

1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування гліцину.

Гліцин входить до складу ноотропних засобів, тобто поліпшує психічну та розумову діяльність, і, відповідно, впливає на когнітивні властивості людини.

Гліцин проявляє седативну, снодійну, психостимулюючу дію, знижує алкозалежність і абсинентний синдром.

Терапевтично препарат застосовують:

- при виникненні стресових ситуацій;
- захворюванні нервової системи;
- при порушеннях сну;
- при порушенні мозкового кровообігу;
- при зниженні больового симптому у суглобах;
- для покращення зовнішності.

Добова норма при терапії дорослої людини становить близько 3г.

Побічні ефекти можуть спостерігатися у вигляді алергічних проявів (загальна слабкість, риніт, висипання тощо)[3].

1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення гліцину.

Ідентифікація:

- Фізико-хімічними методами (за ІЧ – спектром поглинання або методом ТШХ з різноманітними проявниками;
- Окислювальне декарбосилування. Спочатку спостерігають фіолетове забарвлення із зеленувато-жовтою флуоресценцією, яке переходить у жовте забарвлення через помаранчеву стадію [13-15].

Кількісне визначення:

Згідно з ДФУ гліцин кількісно визначають неводним титруванням (титрант 0,1 HClO_4) у середовищі мурашиної та льодяної оцтової кислоти (1:10), точку еквівалентності визначають потенціометрично [13-15].

У літературних джерелах можна знайти також і спектрофотометричні методи кількісного визначення гліцину, наприклад, на основі взаємодії цієї амінокислоти з 7,7,8,8,-тетраціанохінодиметаном [16].

1.6. Сполука 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон як реагент у фотометричних методах дослідження.

Метод спектрофотометрії є одним з фізико-хімічних методів дослідження, який найбільш часто використовується при стандартизації лікарських засобів, у фармацевтичному виробництві, в аналітичній практиці при апробації нових методів кількісного визначення різноманітних лікарських засобів та дієтичних добавок. За класифікацією інструментальних методів дослідження спектрофотометрію відносять до оптичних абсорбційних методів. Техніка виконання методу є простою та експресною, але, іноді, визначенню передують фотометрична реакція. Фотометричними реагентами може бути величезна група речовин різної хімічної природи, одним з фотометричних реагентів у фотометричних методах є 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон.

Сполука 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон широко використовується і в інших галузях народного господарства, наприклад, у синтезі різноманітних барвників, як фунгіцид для боротьби зі шкідниками у сільському господарстві тощо. Одержують сполуку декількома способами: хлоруванням нафтолової кислоти у 60%-ому розчині сульфатної кислоти, хлоруванням 1,4-нафтохінону або α -нафтолу. За зовнішнім виглядом це кристалічна сполука золотаво-жовтого кольору, погано розчиняється у воді, але добре розчинна в органічних спиртах, наприклад, етиловому, молярна маса 227,06 г/моль. Є стійкою сполукою до дії тепла та кислот, але розкладається під дією лугів. Речовина середньої токсичності, пригнічує загально трофічні процеси у організмі. ГДК 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону становить 0,5 мг/м³. Сполуку 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон пропонують використовувати при кількісному визначенні і інших амінокислот, наприклад, ацетілцистеїну безпосередньо у лікарських засобах[17].

Розділ 2. Експериментальна частина.

Випускна кваліфікаційна робота 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 дослідження випускної кваліфікаційної роботи було моделювання, розробка та апробація нової експресної методики кількісного визначення амінокислоти гліцин у сублінгвальних таблетках.

2.1.2. Об'єкти дослідження.

Об'єктами дослідження обрали сублінгвальні таблетки, діючою речовиною яких є амінокислота гліцин (Рис.2):

Зразок 1. Таблетки виробника ПАТ Хімфармзавод Червона зірка, 1 таблетка містить гліцину 100 мг.

Допоміжними речовинами є повідон та магній стеарат.

Зразок 2. Таблетки виробника ПП Гледекс, 1 таблетка містить гліцину 100 мг.

Допоміжними речовинами є повідон, віск монтановий гліколевий, амонійно-метакрилатний сополімер, кальцію стеарат.

Сублінгвальні таблетки реалізуються аптечними мережами, склад зазначено у інструкціях для медичного застосування:

Зразок 1



Зразок 2



Рис.2. Сублінгвальні таблетки, до складу яких входить гліцин[2].

2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Спектрофотометр Jenway 6305(Додаток 3).
2. Мірний лабораторний посуд і піпетки класу точності А. (Додаток 4).
3. Ваги лабораторні MettlerToledoXS204. (Додаток 5).
4. Лабораторна парцелянова ступка.
5. Водяна баня.

2.1.4. Реактиви.

- 1.Фармакопейний стандартний зразок ДФУ Гліцину (**Glycine**) каталожний номер G0185 реєстраційний номер **56-40-6**.
2. Барвник 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон х.ч.
3. Вода дистильована.
4. Диметилформамід ч.д.а.

2.2. Приготування розчинів.

2.2.1. Приготування 1,0 % розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону.

Молярна маса 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону 227,06 г/моль. На аналітичних терезах зважують 0,01 г 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону. Поміщають наважку у мірну колбу на 1 л, розчиняють наважку у ДМФА.

2.2.2. Приготування стандартного розчину гліцину.

100 мг (точна наважка) стандартного фармакопейного зразку гліцину переносять у мірну колбу на 25 мл, спочатку розчиняють у 10 мл води, струшують, доводять розчином ДМФА до позначки. Відбирають 1 мл приготованого розчину і переносять у мірну колбу на 25 мл, додають 3 мл приготованого 1 % розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону, струшують. Одержаний розчин нагрівають на водяній бані 20 хвилин при температурі 90⁰С і після охолодження доводять до риси розчинником ДМФА.

Концентрація гліцину у розчині становить 4 мг/25 мл (для зручності 16 мг/100 мл).

2.2.3. Приготування аналізованого розчину гліцину.

Таблетку кожного зразка окремо розтирають у лабораторній парцеляновій ступці. Порошок переносять у мірну колбу на 25 мл, розчиняють у 10 мл води, струшують, доводять розчином ДМФА до позначки, фільтрують. Відбирають 1 мл приготованого розчину і переносять у мірну колбу на 25 мл, додають 3 мл приготованого 1 % розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону, струшують. Одержаний розчин нагрівають на водяній бані 20 хвилин при температурі 90⁰С і після охолодження доводять до риси розчинником ДМФА.

2.3. Спектрофотометричне визначення гліцину, який входить до складу сублінгвальних таблеток.

Визначення оптичної густини A проводять при довжині хвилі 470 нм на фоні компенсаційного розчину, який не містить гліцину.

2.4. Розрахунок концентрації гліцину в аналізованому розчині.

У роботі використовують «метод стандарту». Сутність методу заключається у тому, що Дослідник вимірює оптичну густину стандартного розчину та аналізованого розчину при однакових умовах.

Кількісний вміст гліцину у зразку здійснюють за стандартною формулою спектрофотометричних визначень:

$$\% = A_x \cdot C_c / A_c$$

A_x , A_c – оптична густина аналізованого розчину та стандартного розчину;

C_c – концентрація стандарту.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

При проведенні бібліосемантичного аналізу методик кількісного визначення амінокислот з використанням суміші вода-ДМФА та 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону ми з'ясували з літературних джерел [18-20], що існує низка факторів, яка може впливати на перебіг реакції. Для подальших досліджень ми приготували серію стандартних розчинів з концентрацією діючої речовини 5,00; 5,50; 6,00; 6,50; 7,00; 7,50; 8,00 мг/100 мл загальновідомими методиками розведення зі стандартного розчину (п.2.2.2.):

- Розчин 1, концентрація 5,00 мг/100мл.

Відбирали 31,25 мл аліквоти стандартного розчину концентрації 16 мг/100мл і доводили ДМФА до 100 мл;

- Розчин 2, концентрація 5,50 мг/100мл.

Відбирали 34,37 мл аліквоти стандартного розчину концентрації 16 мг/100мл і доводили ДМФА до 100 мл;

- Розчин 3, концентрація 6,00 мг/100мл.

Відбирали 37,50 мл аліквоти стандартного розчину концентрації 16 мг/ мл і доводили ДМФА до 100 мл;

- Розчин 4, концентрація 6,50 мг/100мл.

Відбирали 40,63 мл аліквоти стандартного розчину концентрації 16 мг/ мл і доводили ДМФА до 100 мл;

- Розчин 5, концентрація 7,00 мг/100мл.

Відбирали 43,75 мл аліквоти стандартного розчину концентрації 16 мг/ мл і доводили ДМФА до 100 мл;

- Розчин 6, концентрація 7,50 мг/100мл.

Відбирали 46,87 мл аліквоти стандартного розчину концентрації 16 мг/мл і доводили ДМФА до 100 мл;

- Розчин 7, концентрація 8,00 мг/мл.

Відбирали 50,0 мл аліквоти стандартного розчину концентрації 16 мг/мл і доводили ДМФА до 100 мл.

3.1. Аналіз нагрівання реакційної суміші.

Для вирішення питання щодо оптимального режиму нагрівання реакційної суміші ми провели попередній експеримент і проаналізували залежність оптичної густини розчину А від часу нагрівання. Дослідження проводили з розчином гліцину, концентрація якого була 6,0 мг/100 мл. До розчину додавали 3 мл 1 % розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону, нагрівали на водяній бані до 90⁰С та вимірювали оптичну густину. Результати наведено на Рис.3.

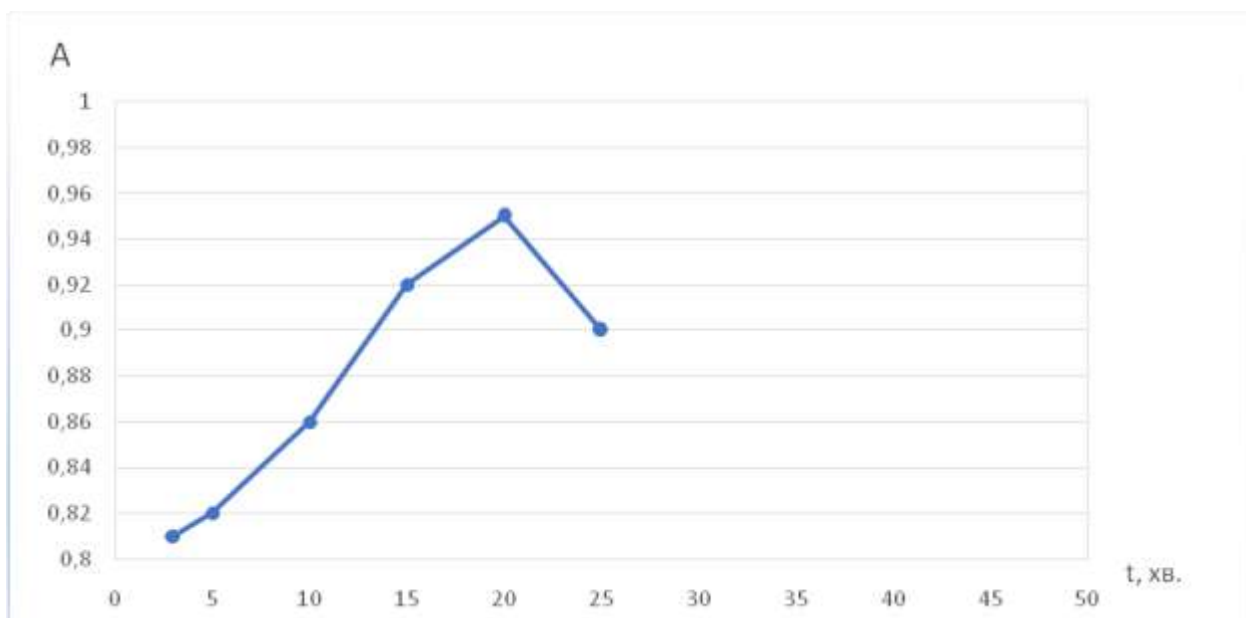


Рис.3. Залежність оптичної густини А від часу нагрівання.

Оптимальне значення оптичної густини зафіксували через 20 хв. нагрівання досліджуваного розчину на водяній бані.

3.2. Аналіз залежності оптичної густини A від довжини хвилі λ (побудова спектра поглинання).

Для визначення оптимального значення довжини хвилі λ , при якій доцільно проводити спектрофотометричне вимірювання, ми проаналізували залежність оптичної густини A продукту фотометричної реакції гліцину з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном від довжини хвилі λ , тобто побудували спектр поглинання.

Для побудови спектра поглинання використовували стандартний розчин гліцину з концентрацією 6 мг/100 мл. Для наочності залежність оптичної густини A від довжини хвилі представлено на Рис.4:

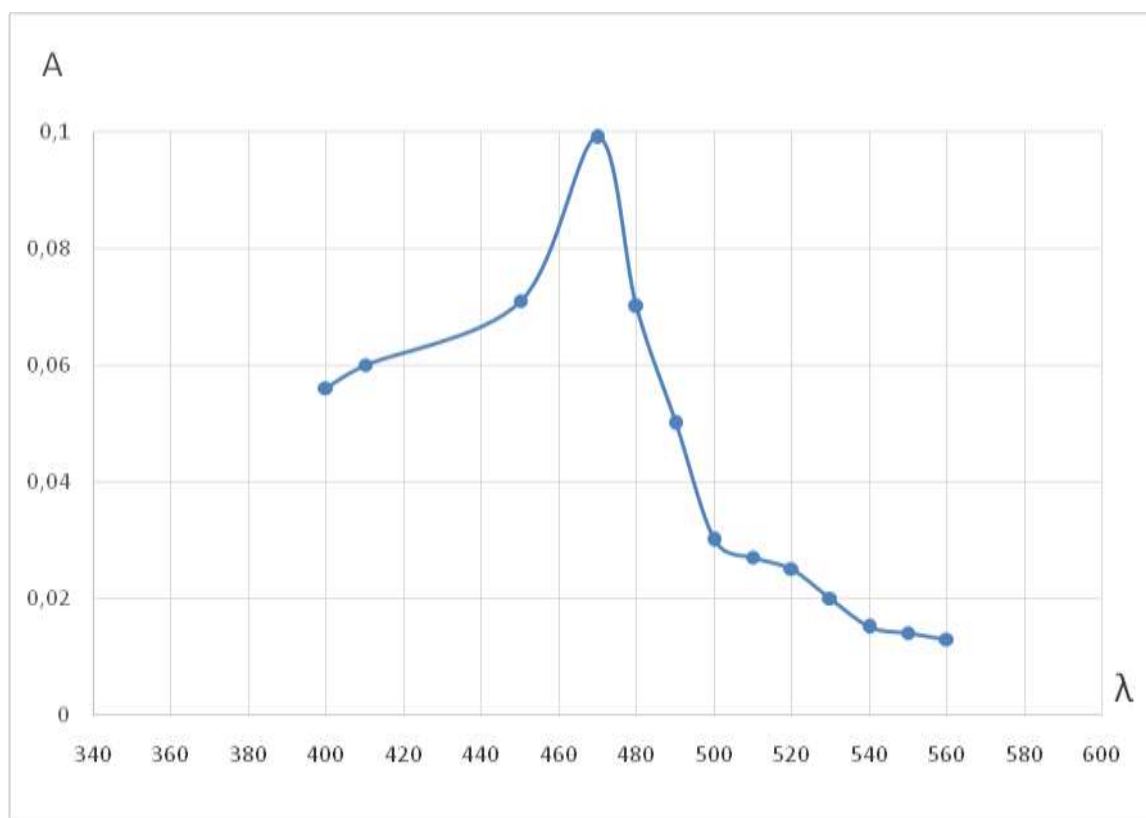


Рис. 4. Залежність величини оптичної густини A від довжини хвилі λ аналізованого розчину (продукту фотометричної реакції гліцину з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном).

3.3. Перевірка лінійності методики.

Лінійність методики вивчали на розведених стандартних розчинах, які були приготовані попередньо.

Залежність оптичної густини A від концентрації розведених стандартних розчинів у нормалізованій системі координат (калібрувальний графік) представлено на Рис.5.:

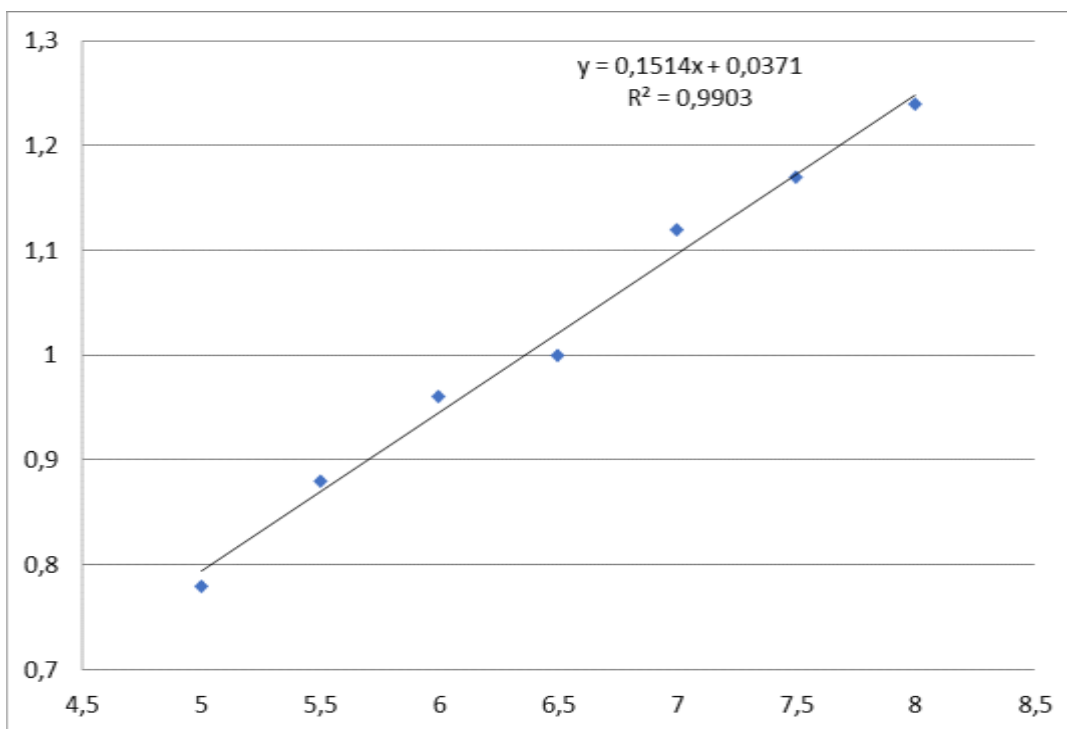


Рис. 5. Калібрувальний графік гліцину.

Оцінка лінійності методики.

Визначення залишкової дисперсії здійснювали за формулою:

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

$$s_0^2 = 0,000314$$

Згідно ДФУ значення залишкової дисперсії не повинне відрізнятися значущо за критерієм Фішера від дисперсії збіжності.

Дисперсії констант лінійної залежності розраховували за рівнянням:

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

$$s_b^2 = 4.4909 \cdot 10^{-5}$$

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

$$s_a^2 = 0,0019423$$

Стандартні відхилення і величини напівширини довірчих інтервалів визначали згідно математичних рівнянь:

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

$$s_b = 0,00670139$$

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

$$s_a = 0,04407$$

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

$$t(0.95, 5) = 2,5706$$

$$\Delta_b = 0,017227 \approx 0,0172$$

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

$$\Delta_a = 0,11329 \approx 0,1133$$

Результатом статистичної обробки є рівняння лінійної регресії

$y = 0,1514x + 0,0371$ ($y = ax + b$), довірчий інтервал для коефіцієнта a : $0,1514 \pm 0,1133$, довірчий інтервал для коефіцієнта b : $0,0371 \pm 0,0172$.

Згідно з вимогами ДФУ методику можна вважати лінійною.

3.4. Визначення стабільності розчину продукту гліцину з 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону у часі.

Для визначення стабільності розчину гліцину з барвником використовували стандартний розчин гліцину з концентрацією 6 мг/100 мл. Визначення величини оптичної густини проводили кожні 10 хвилин, нижчезазначено результати та статистична обробка експериментальних даних:

Оптична густина А					RSD,%	Відносна похибка середнього значення %
0 хв.	10хв.	20хв.	30хв.	40хв.		
0,099	0,094	0,095	0,095	0,102	3,5	4,33

$\bar{x} = 0,097$, $s = 0,00339 \approx 0,0034$, $s_r = 0,03496 \approx 0,035$, $RSD \approx 3,5\%$, $s^2 = 1,15 \cdot 10^{-5}$.

Коефіцієнт Стьюдента при $P=0,95$ та числі ступенів свободи 4 – 2,7764

$$\Delta_{\bar{x}} = 0,004211 \approx 0,0042$$

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 0,097 \pm 0,0042$$

відносна похибка середнього значення $\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100\%$, $\bar{\varepsilon} = 4,33\%$

Враховуючи вищезазначені результати[21-22] можна зробити висновок про те, що аналізовані розчини є стабільними у часі.

3.5. Кількісне визначення гліцину у сублінгвальних таблетках.

Після визначення оптимальних умов спектрофотометричного визначення гліцину у стандартних розчинах ми провели кількісне визначення амінокислоти в об'єктах дослідження (Зразок 1 та Зразок 2). Результати представлено у Таблиці 1:

Таблиця 1. Кількісне визначення гліцину в об'єктах дослідження.

№ проби	Вміст знайденої діючої речовини у сублінгвальних таблетках, мг	
	Зразок 1	Зразок 2
1	98,4	102,2
2	101,8	101,7
3	101,1	101,5
4	100,8	101,4
5	100,3	98,7

Обсяг вибірки дорівнює 5, концентрація діючої речовини гліцин згідно з інструкціями для медичного застосування 100 мг.

Визначення присутності систематичної помилки.

1) Визначення величини середнього значення:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n},$$

$$\bar{x} \text{ (зразок 1)} = 100,48 \text{ мг}$$

$$\bar{x} \text{ (зразок 2)} = 101,1 \text{ мг}$$

2) Визначення RSD – відносного стандартного відхилення у відсотках:

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

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

$$s \text{ (зразок 1)} = 1,2834$$

$$s \text{ (зразок 2)} = 1,3766$$

$$s_r \text{ (зразок 1)} = 0,01277$$

$$s_r \text{ (зразок 2)} = 0,01362$$

$$RSD \text{ (зразок 1)} \approx 1,28\%$$

$$RSD \text{ (зразок 2)} \approx 1,36\%$$

3) Визначення значення дисперсії:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{v},$$

або

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

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

$$s^2 \text{ (зразок 1)} = 1,647$$

$$s^2 \text{ (зразок 2)} = 1,895$$

4) Визначення довірчого інтервалу:

$$\bar{x} \pm t_{P,v} \frac{s}{\sqrt{n}} = \bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}},$$

де \bar{x} – середнє значення вибірки, s – стандартне відхилення, n – обсяг вибірки, $t_{P,v}$ – коефіцієнт Стюдента або t -критерій, $\Delta_{\bar{x}}$ – напівширина довірчого інтервалу; коефіцієнт Стюдента при $P=0,95$ та числі ступенів свободи 4 – 2,7764.

У нашому дослідженні, використовуючи довірчий інтервал, ми оцінювали параметр «правильність» отриманих результатів, а саме:

$$\Delta_{\bar{x}} \text{ (зразок 1)} = 1,59.$$

Враховуючи вищезазначене, для Зразку 1 довірчий інтервал приймає вигляд:

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 100,48 \pm 1,59$$

Довірчий інтервал для зразку 1 $\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 100,48 \pm 1,59$, тобто від 98,89 до 102,07 (значення 100 мг потрапляє у цей інтервал, результати можна вважати правильними).

Для Зразку 2 довірчий інтервал приймає вигляд:

$$\Delta_{\bar{x}} (\text{зразок 2}) = 1,71$$

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 101,1 \pm 1,71.$$

Іншими словами, довірчий інтервал для Зразку 2 знаходиться у межах від 99,39 до 102,81. Значення 100 мг знаходиться у знайденому довірчому інтервалі, отримані результати можна вважати правильними і константувати, що дана методика не містить систематичної помилки.

Відносну помилку середнього значення розраховували за формулою:

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

$$\bar{\varepsilon} (\text{зразок 1}) = 1,58\%$$

$$\bar{\varepsilon} (\text{зразок 2}) = 1,70\%$$

Враховуючи вищенаведені статистичні величини можна вважати альтернативну методику спектрофотометричного визначення гліцину у таблетках правильною[21-22].

3.6. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення гліцину у різноманітних лікарських засобах, дієтичних добавках та субстанції.

Після ознайомлення з літературними джерелами та проведення бібліосемантичного аналізу різноманітних методик кількісного визначення амінокислоти гліцин ми погоджуємося з авторами роботи [18] щодо найбільш доцільнішого, на наш погляд, спектрофотометричного методу аналізу у цьому випадку. Згодні, що метод ВЕРХ (як і РХ) є найточнішим методом дослідження, але використання цих методів у роботі вимагає складного апаратурного обладнання і висококомпетентних спеціалістів, що є достатньо проблематичним в умовах сьогодення.

Згідно з нормативними документами (ДФУ) кількісно амінокислоти визначають неводним титруванням. Нажаль, неводне титрування не можна вважати екологічно безпечним і за точністю метод поступається спектрофотометрії.

Враховуючи вищезазначене, можна зробити висновок про те, що одним з актуальних питань в аналітичній та фармацевтичній хімії є пошук нових методик кількісного визначення амінокислот у лікарських засобах та дієтичних добавках оптичними методами дослідження, серед яких у царині знаходиться спектрофотометрія.

ВИСНОВКИ

1. Результатом проведення бібліосемантичного аналізу визначено фізико-хімічні, фармакологічні властивості гліцину, його терапевтичну дію.
2. Проаналізовано методики ідентифікації та кількісного визначення гліцину у субстанції та лікарських засобах. Розроблено та апробовано спектрофотометричне визначення гліцину у сублінгвальних таблетках з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном.
3. Проведено часткову валідацію запропонованої методики згідно з умовами ДФУ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/6157/aminokisloti>.
2. Компендиум 2015 — лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, — К., 2015.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. — М., 2000. — Т.2; От субстанции к лекарству / Под ред. В.П. Черных. — Х., 2005.
4. Фармакологія за Рангом і Дейлом, пер.9-го англ.вид. у 2-х томах Т.1/Джеймс М.Рітер, Род Флавер, Грем Гендерсон, Юн Конг Лоук, Девід Мак К,юн, Гемфрі П Ранг; наук.ред.перекл. Ганна Зайченко, Микола Хайтович.-К.ВСВ ”Медицина“, 2021-588 с.
5. Фармакологія з основами патології / Колесник Ю.М.,Чекман І.С., Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Нагорна О.О., Бухтіярова Н.В., Моргунцова С.А., Зайченко Г.В. : підручник. Вінниця: Нова книга, 2021. – 572 с.
6. Побічна дія ліків: підручник для студентів вищих навчальних закладів медичної освіти/Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В, Самура Т.А., Бухтіярова Т.А., Нагорна О.О., Моргунцова С.А., Єгоров А.А., Риженко О.В., Тихоновський О.В. Запорізький державний медичний Університет. Вінниця: Нова книга, 2021. – 360 с.
7. Фармакологія. Підручник для медичних і стоматологічного факультетів Вищих медичних навчальних закладів освіти. І.С.Чекман, В.М.Бобирьов, В.В.Кресюн, В.В.Годован, Н.О.Горчакова, Л.І.Казак, Т.В.Кава, Г.Ю.Островська Т.А.Петрова, Л.М.Рябушко Вінниця: Нова книга, 2020. – 472 с.
8. Довідник еквівалентності лікарських засобів Rx index Спеціалізоване медичне видання / за ред І.А. Зупанця, В.П. Черних 4 вид. Перероблене К.: Фармацевт практик- 2020. – 2033 с.
9. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.

10. www.pharma-center.com.ua. веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page] URL.
11. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3003/glicin>.
12. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.
13. State Pharmacopoeia of Ukraine. 1st appearance., Additional. 2. - Kharkiv: State Enterprise "Scientific Experimental Pharmacopoeia Center", 2008 - 620 p.
14. State Pharmacopoeia of Ukraine. 1st appearance., Additional. 1. - Kharkiv: State Enterprise "Scientific Experimental Pharmacopoeia Center", 2004 - 520 p.
15. British Pharmacopoeia. - Her Majesty's Stationery Office. - London, 2000.
16. Theia'a N. Al-Sabha, Najwa M. Al-Karemy. Spectrophotometric determination of some amino acids using a 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane reagent // J. Anal. Chem - 2007. - V. 3. - P. 190-195.
17. https://chemtest.com.ua/ua/2_3-dikhlor-1_4-naftokhnon.
18. Portna, K. P., & Vasyuk, S. O. (2018). Кількісне визначення гліцину в лікарських формах за реакцією з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном. *Фармацевтичний журнал*, (3), 78-83.
19. Snežana S. Mitić, Aleksandra N. Pavlovic, Snezhana B. Tošić et al. Quantitative determination of glycine in commercial dosage forms by kinetic spectrophotometry // J. Anal. Chem - 2009. - V. 64. - P. 683-689.
20. Hasani M., Yaghoubi L., Abdollahi H. A kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of glycine and lysine by artificial neural networks // Anal. Biochem - 2007. - No. 365, No. 1. - P. 74-81.
21. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : PIPEГ,

2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.

22.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.

ДОДАТКИ

Додаток 1.

Витяг з Європейської фармакопеї

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

Glycine

Reference solution (a). Dissolve 0.10 g of *glyceryl trinitrate solution CRS* and a quantity of *diluted pentaerythrityl tetranitrate CRS* equivalent to 1.0 mg of pentaerythrityl tetranitrate in the mobile phase and dilute to 100.0 mL with the mobile phase. Sonicate and filter if necessary.

Reference solution (b). Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the mobile phase.

Column:

- size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;
- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 μ m).

Mobile phase: acetonitrile R, water R (50:50 V/V).

Flow rate: 1 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 210 nm.

Injection: 20 μ L.

Run time: 3 times the retention time of the principal peak.

System suitability: reference solution (a):

- resolution: minimum 2.0 between the peaks due to glyceryl trinitrate and to pentaerythrityl tetranitrate.

Limits:

- any impurity: not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (1 per cent, expressed as glyceryl trinitrate);
- total: not more than 3 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (3 per cent, expressed as glyceryl trinitrate);
- disregard limit: 0.1 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.1 per cent).

ASSAY

Test solution. Prepare a solution containing 1.0 mg of glyceryl trinitrate in 250.0 mL of *methanol R*.

Reference solution. Dissolve 70.0 mg of *sodium nitrite R* in *methanol R* and dilute to 250.0 mL with the same solvent. Dilute 5.0 mL of the solution to 500.0 mL with *methanol R*.

Into three 50 mL volumetric flasks introduce 10.0 mL of the test solution, 10.0 mL of the reference solution and 10 mL of *methanol R* as a blank. To each flask add 5 mL of *dilute sodium hydroxide solution R*, close the flask, mix and allow to stand at room temperature for 30 min. Add 10 mL of *sulfanilic acid solution R* and 10 mL of *dilute hydrochloric acid R* and mix. After exactly 4 min, add 10 mL of *naphthylethylenediamine dihydrochloride solution R*, dilute to volume with *water R* and mix. After 10 min read the absorbance (2.2.25) of the test solution and the reference solution at 540 nm using the blank solution as the compensation liquid.

Calculate the percentage content of glyceryl trinitrate using the following expression:

$$\frac{A_T \times m_S \times C}{A_R \times m_T \times 60.8}$$

- A_T = absorption of the test solution;
- m_T = mass of the substance to be examined, in milligrams;
- C = percentage content of sodium nitrite used as reference;
- A_R = absorption of the reference solution;
- m_S = mass of sodium nitrite, in milligrams.

STORAGE

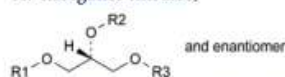
Store the diluted solutions (10 g/L) protected from light, at a

LABELLING

The label states the declared content of glyceryl trinitrate.

IMPURITIES

A. inorganic nitrates,



- B. R1 = NO₂, R2 = R3 = H: (2RS)-2,3-dihydroxypropyl nitrate,
- C. R1 = R3 = H, R2 = NO₂: 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl nitrate,
- D. R1 = R2 = NO₂, R3 = H: (2RS)-3-hydroxypropane-1,2-diyl dinitrate,
- E. R1 = R3 = NO₂, R2 = H: 2-hydroxypropane-1,3-diyl dinitrate.

01/2008:0614
corrected 6.0

GLYCINE

Glycinum



C₂H₅NO₂
[56-40-6]

M_r 75.1

DEFINITION

2-Aminoacetic acid.

Content: 98.5 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, crystalline powder.

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

It shows polymorphism (5.9).

IDENTIFICATION

First identification: A.

Second identification: B, C.

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: *glycine CRS*.

If the spectra obtained in the solid state show differences, dissolve the substance to be examined and the reference substance separately in the minimum volume of *ethanol (60 per cent V/V) R*, evaporate to dryness and record the spectra again.

B. Examine the chromatograms obtained in the test for ninhydrin-positive substances.

Results: 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).

C. Dissolve 50 mg in 5 mL of *water R*, add 1 mL of *strong sodium hypochlorite solution R* and boil for 2 min. Add 1 mL of *hydrochloric acid R* and boil for 4-5 min. Add 2 mL of *hydrochloric acid R* and 1 mL of a 20 g/L solution of *resorcinol R*, boil for 1 min and cool. Add 10 mL of *water R* and mix. To 5 mL of the solution add 6 mL of *dilute sodium hydroxide solution R*. The solution is violet with greenish-yellow fluorescence. After a few minutes, the colour becomes orange and then yellow and an intense fluorescence remains.

04/2011:1783

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution Y₇ (2.2.2, Method II).

pH (2.2.3): 5.9 to 6.4.

Dilute 10 mL of solution S to 20 mL with *carbon dioxide-free water R*.

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

Test solution (a). Dissolve 0.10 g of the substance to be examined in *water R* and dilute to 10.0 mL with the same solvent.

Test solution (b). Dilute 1.0 mL of test solution (a) to 10.0 mL with *water R*.

Reference solution (a). Dissolve 10 mg of *glycine CRS* in *water R* and dilute to 10.0 mL with the same solvent.

Reference solution (b). Dilute 1.0 mL of test solution (a) to 200 mL with *water R*.

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

Plate: *cellulose for chromatography R* as the coating substance.

Mobile phase: *glacial acetic acid R, water R, butanol R* (20:20:60 V/V/V).

Application: 5 µL.

Development: over 2/3 of the plate.

Drying: at 80 °C for 30 min.

Detection: spray with *ninhydrin solution R* and dry at 100–105 °C for 15 min.

System suitability: the chromatogram obtained with reference solution (c) shows 2 clearly separated spots.

Limits: in the chromatogram obtained with test solution (a):

- **any impurity:** any spots, apart from the principal spot, are not more intense than the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.5 per cent).

Chlorides (2.4.4): maximum 75 ppm.

Dissolve 0.67 g in *water R* and dilute to 15 mL with the same solvent.

Heavy metals (2.4.8): maximum 10 ppm.

12 mL of solution S complies with test A. Prepare the reference solution using *lead standard solution (1 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 105 °C for 2 h.

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

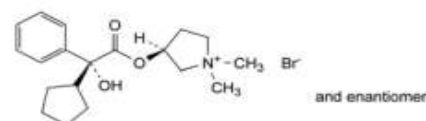
ASSAY

Dissolve 70.0 mg in 3 mL of *anhydrous formic acid R* and add 30 mL of *anhydrous acetic acid R*. Immediately after dissolution, 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 7.51 mg of C₁₉H₂₈BrNO₃.

GLYCOPYRRONIUM BROMIDE

Glycopyrronii bromidum



C₁₉H₂₈BrNO₃
[51186-83-5]

M_r 398.3

DEFINITION

(3*RS*)-3-[(2*SR*)-(2-Cyclopentyl-2-hydroxy-2-phenylacetyl)oxy]-1,1-dimethylpyrrolidinium bromide.
Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, crystalline powder.

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

IDENTIFICATION

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: *glycopyrronium bromide CRS*.

B. It gives reaction (a) of bromides (2.3.1).

TESTS

Solution S. Dissolve 0.5 g in *carbon dioxide-free water R* and dilute to 25 mL with the same solvent.

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

Acidity or alkalinity. To 10 mL of solution S add 0.05 mL of *phenolphthalein solution R1*. The solution is colourless. Not more than 0.2 mL of 0.01 M *sodium hydroxide* is required to change the colour of the indicator to pink. Add 0.4 mL of 0.01 M *hydrochloric acid* and 0.05 mL of *methyl red solution R*. The solution is red or orange.

Impurity N. Liquid chromatography (2.2.29).

Solution A. Dissolve 3.2 g of *sodium dihydrogen phosphate monohydrate R* in 900 mL of *water R*, adjust to pH 6.5 with *dilute sodium hydroxide solution R* and dilute to 1000 mL with *water R*.

Test solution. Dissolve 50.0 mg of the substance to be examined in the mobile phase and dilute to 50.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (a). Dissolve 2.0 mg of *glycopyrronium impurity N CRS* in 10.0 mL of the mobile phase.

Reference solution (b). Dilute 1.0 mL of reference solution (a) to 100.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (c). Dilute 1.0 mL of the test solution and 5.0 mL of reference solution (a) to 25.0 mL with the mobile phase.

Column:

- **size:** *l* = 0.25 m, Ø = 4.0 mm;
- **stationary phase:** *silica gel BC for chiral chromatography R* (5 µm);
- **temperature:** 30 °C.

Mobile phase: *acetonitrile R1, solution A, methanol R2* (10:40:50 V/V/V).

Flow rate: 1.0 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 222 nm.

Injection: 10 µL of the test solution and reference solutions (b) and (c).

Run time: 1.5 times the retention time of glycopyrronium.

Додаток 2. Витяг з ДФУ

Гліцин

ГЛІЦИН

Glycinum

GLYCINE



$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$
[56-40-6]

М.м. 75.1

2-Амінооцтова кислота.

Вміст: не менше 98.5 % і не більше 101.0 %, у перерахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору.

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

Виявляє поліморфізм (5.9).

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А.
Друга ідентифікація: В, С.

А. Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Відповідність: спектру ФСЗ гліцину.

У разі різниці одержаних для речовин у твердому стані спектрів окремо розчиняють субстанцію та ФСЗ гліцину в мінімальному об'ємі етанолу (60 %, об/об) *P*, упарюють насухо та повторно записують спектри одержаних залишків.

В. Переглядають хроматограми, одержані у випробуванні «Речовини, виявлені нінгідрином».

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину (b) має виявитися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром і забарвленням.

С. 50 мг субстанції розчиняють у 5 мл води *P*. До одержаного розчину додають 1 мл натрію гіпохлориту розчину концентрованого *P*, кип'ячать протягом 2 хв, додають 1 мл хлористоводневої кислоти *P* і кип'ячать протягом (4-5) хв. Потім додають 2 мл хлористоводневої кислоти *P* і 1 мл розчину 20 г/л резорцину *P*, кип'ячать протягом 1 хв і охолоджують. Додають 10 мл води *P* і перемішують. До 5 мл одержаного розчину додають 6 мл натрію гідроксиду розчину розведеного *P*; розчин забарвлюється у фіолетовий колір із зеленувато-жовтою флуоресценцією. Через

декілька хвилин забарвлення розчину переходить в оранжеве, потім у жовте, а інтенсивна флуоресценція залишається.

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 5.0 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, *P* 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 Y₇.

pH (2.2.3). Від 5.9 до 6.4. 10 мл розчину S доводять водою, вільною від вуглецю діоксиду, *P* до об'єму 20 мл.

Речовини, виявлені нінгідрином. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин (a). 0.10 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

Випробовуваний розчин (b). 1.0 мл випробовуваного розчину (a) доводять водою *P* до об'єму 10.0 мл.

Розчин порівняння (a). 10 мг ФСЗ гліцину розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

Розчин порівняння (b). 1.0 мл випробовуваного розчину (a) доводять водою *P* до об'єму 200 мл.

Розчин порівняння (c). 10 мг ФСЗ гліцину та 10 мг ФСЗ аланіну розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25 мл.

Пластика: целюлоза для хроматографії *P* як тонкий шар.

Рухома фаза: оцтова кислота льодяна *P* - вода *P* - бутанол *P* (20:20:60).

Об'єм проб: 5 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 2/3 довжини пластинки.

Висушування: при температурі 80 °С протягом 30 хв.

Виявлення: обприскують нінгідрином розчином *P* і витримують при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв.

Придатність хроматографічної системи: на хроматограмі розчину порівняння (c) виявляються дві чіткі розділені плями.

Нормування: хроматограма випробовуваного розчину (a):

— *будь-яка домішка:* будь-яка пляма, крім основної, має бути не інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.5 %).

Хлориди (2.4.4). Не більше 0.0075 % (75 ppm).

Глутамінова кислота

0.67 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 15 мл.

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

12 мл розчину *S* мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням свинцю еталонного розчину (1 ppm *Pb*) *P*.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 0.5 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.

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

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

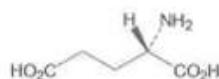
70.0 мг субстанції розчиняють у 3 мл мурашиної кислоти безводної *P*, додають 30 мл оцтової кислоти безводної *P* і відразу титрують 0.1 *M* розчином хлорної кислоти потенціометрично (2.2.20).

1 мл 0.1 *M* розчину хлорної кислоти відповідає 7.51 мг $C_5H_9NO_2$.

ГЛУТАМІНОВА КИСЛОТА

Acidum glutamicum

GLUTAMIC ACID



$C_5H_9NO_2$
[56-86-0]

М.м. 147.1

Глутамінова кислота містить не менше 98.5 % і не більше 100.5 % (2*S*)-2-амінопентандіової кислоти, у перерахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

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

Розчинність. Легко розчинна в киплячій воді *P*, мало розчинна в холодній воді *P*, практично не розчинна в оцтовій кислоті *P*, ацетоні *P* та етанолі (96 %) *P*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, В.

Друга ідентифікація: А, С, D.

А. Субстанція має відповідати вимогам щодо питомого оптичного обертяння як зазначено в розділі «Випробування».

В. Інфрачервоний спектр (2.2.24) субстанції, одержаний у дисках, має відповідати спектру ФСЗ глутамінової кислоти. У разі різниці одержаних спектрів окремо розчиняють субстанцію та ФСЗ глутамінової кислоти у мінімальному об'ємі води *P*, упарюють насухо при температурі 60 °С і повторно записують спектри одержаних залишків.

С. 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.

D. До 2.0 мл розчину *S*, приготованого як зазначено в розділі «Випробування», додають 0.1 мл фенолфталеїну розчину *P*, від 3.0 мл до 3.5 мл 1 *M* розчину натрію гідроксиду до появи червоного забарвлення. Потім додають суміш 3 мл формальдегіду розчину *P*, 3 мл води, вільної від вуглецю діоксиду, *P* і 0.1 мл фенолфталеїну розчину *P*, до якої попередньо доданий 1 *M* розчин натрію гідроксиду до появи рожевого забарвлення; розчин знебарвлюється. До одержаного розчину додають 1 *M* розчин натрію гідроксиду до появи червоного забарвлення. Загальний об'єм витраченого 1 *M* розчину натрію гідроксиду має бути від 4.0 мл до 4.7 мл.

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 5.00 г субстанції при слабому нагріванні розчиняють в 1 *M* розчині хлористоводневої кислоти та доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 50.0 мл.

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

Кольоровість розчину (2.2.2, метод II). Розчин *S* має бути безбарвним.

Питоме оптичне обертяння (2.2.7). Від +30.5 до +32.5, у перерахунку на суху речовину. Визначення проводять, використовуючи розчин *S*.

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

Випробовуваний розчин (a). 0.10 г субстанції розчиняють у 5 мл аміаку розчину розведеного *P2* і доводять об'єм розчину водою *P* до 10 мл.

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

Додаток 3.

Спектрофотометр Jenway 6305 (Велика Британія).



Діапазон довжин хвиль	від 198 до 1000 нм
Дозвіл довжини хвилі	1 нм
Точність довжини хвилі	± 2 нм
Спектральна смуга пропускання	8 нм, 6 нм в діапазоні УФ
Коефіцієнт пропускання	від 0 до 199,9%
Поглинання	-0,300 до 1,999А
Точність	$\pm 1\%$ Т, $\pm 0,01$ Abs при 1000 поглинання
Роздільна здатність	0,1% Т, 0,001А
Стабільність	1% / год після 20-хвилинного нагрівання
Діапазон концентрацій	-300 до 1999
Дозвіл концентрації	1 / 0,1
Одиниці вимірювання	мг/мЗ, мг/л, г/л, моль/л, ед.
Потужність	<50 Вт
Розмір (Ш x Д x В)	365 x 272 x 160 мм
Вага	6 кг

Додаток 4

Ваги лабораторні Mettler Toledo XS204, допустиме навантаження становить 220 г, дискретність – 0,1 мг.



Додаток 5
Мірний посуд класу А.



АНОТАЦІЯ (Summary).

Introduction. Glycine is used in the therapeutic treatment of cardiovascular disease, neurological and endocrinological disorders. The search and testing of new, modern and express methods of quantitative determination of active substances, including glycine, is a priority task of analysts. As a rule, glycine is included in the composition of solid dosage forms (TSF).

The purpose of our study was to develop an alternative method for the quantitative determination of glycine, which is part of TLF, by spectrophotometry, to carry out partial validation.

Results. According to regulatory documents (DFU, European Pharmacopoeia), glycine is quantitatively determined by volumetric non-aqueous titration. In the scientific literature, there are other methods of quantitative determination, including spectrophotometric ones, using certain reagents. When developing our method, we chose 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone as a photometric reagent, as a standard we used the pharmacopoeial standard sample DFU Glycine, the optical density was measured on a spectrophotometer Jenway 6305 at a wavelength of 470 nm. The objects of the study were sublingual solid dosage forms, which includes glycine (100 mg according to the instructions for medical use, Sample 1 and Sample 2).

Preparation of the analyzed solution. The tablet was crushed in a porcelain mortar, the powder was transferred to a 25 ml volumetric flask and first dissolved in 10 ml of water, then brought to the mark with a DMF solution. Filtered. 1 ml of the prepared solution was taken and transferred to a 25 ml flask, 3 ml of 1% solution was added

of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, was stirred, after which the solution was heated for 20 minutes in a water bath at a temperature of 90°C. It was cooled and brought to the limit with DMF solvent.

The obtained results of the quantitative determination of glycine by the spectrophotometric method in Samples 1 and 2 correlate with its content in accordance with the instructions for medical use.

Conclusions. Taking into account the experimental data, it can be stated that the proposed method meets the requirements of the DFU and can be used for the quantitative determination of glycine in solid dosage forms.