

## ВИЗНАЧЕННЯ ДОМІШОК КУПРУМУ У СУБСТАНЦІЇ ГЛІЦИНУ

**Ключові слова:** гліцин, аскорбінова кислота, метиленовий синій, каталітичний кінетичний метод, визначення домішок купруму

Гліцин (аміноацетатна (аміноетанова) кислота) – найпростіша серед аліфатичних амінокислот, яка не має оптичних ізомерів.

Вона входить до складу багатьох білків і біологічно активних сполук. З гліцину в живих клітинах синтезуються порфірини і пуринові основи [5]. Гліцин також є нейромедіаторною амінокислотою. Рецептори до гліцину є в багатьох ділянках головного і спинного мозку та чинять «гальмуючий» вплив на нейрони, зменшують виділення з нейронів «збуджувальних» амінокислот, таких як глутамінова кислота (ГАМК), і підвищують виділення ГАМК [4].

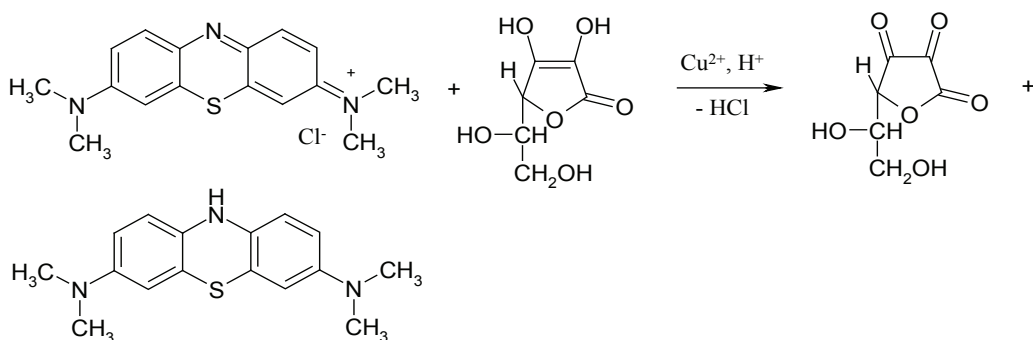
Наявність домішок важких металів у препараті негативно впливає на його стабільність та безпечність. Зокрема, купрум здатний утворювати хелатні сполуки з гліцином, що призводить до зменшення фармакологічної активності останнього [3].

Згідно з ДФ України у субстанції гліцину вміст важких металів рекомендують виявляти візуальним напівкількісним тіоацетамідним методом [2].

У науковій літературі описано високочутливу методику кількісного визначення купруму кінетико-спектрофотометричним методом за реакцією окиснення аскорбінової кислоти метиленовим синім у цитратно-фосфатному буферному розчині у таблетках «*Stress Tabs*» з використанням ультразвуку під час підготовки проби до аналізу [6].

**Метою даного дослідження** було з'ясування можливості застосування кінетико-спектрофотометричного каталітичного методу для визначення вмісту домішок купруму у субстанції гліцину без попереднього здійснення мінералізації зразків проби. Як індикаторна на купрум нами використана реакція каталітичного окиснення аскорбінової кислоти (АК) метиленовим синім (МС) у кислому середовищі з використанням гліцину як буферної речовини (рН 2,2), швидкість якої реєстрували за зменшенням світлопоглинання забарвленого розчину барвника при 620 нм.

Процес відновлення метиленового синього можна зобразити такою схемою:



## **Матеріали та методи дослідження**

*Реагенти.* Використовували реагенти кваліфікації х.ч. або ч.д.а.; розчини виготовляли на одержаній за допомогою кварцового дистилятора двічі дистильованій воді.

Використовували субстанцію лікарської речовини «Гліцин» фармакопейної чистоти (Китай).

Вихідний розчин  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л купруму (II) був виготовлений об'ємно-ваговим методом шляхом розчинення 0,2497 г купруму сульфату п'ятиводного (MERC) у двічі дистильованій воді у мірній колбі об'ємом 1 літр. Одержаний розчин стандартизували методом йодометричного титрування [2]. Робочий розчин  $10^{-5}$  моль/л купруму (II) готували розбавленням вихідного розчину двічі дистильованою водою.

Розчин хлоридної кислоти з концентрацією 4 моль/л отримували методом ізотермічної дистиляції, який розбавляли двічі дистильованою водою до одержання розчину потрібної концентрації.

Розчин АК, додатково очищений за допомогою катіонообмінника КУ-2-8 у  $H^+$ -формі з концентрацією 0,1 моль/л, виготовляли щоденно об'ємно-ваговим методом, шляхом розчинення 1,7610 г наважки АК (MERC) у 100,00 мл двічі дистильованої води. Катіонообмінник КУ-2-8 переводили у  $H^+$ -форму згідно з методикою [1]. Вміст АК у розчині аскорбінової кислоти визначали методом йодометричного титрування [2]. Робочий розчин з концентрацією  $5 \cdot 10^{-2}$  моль/л та рН 2,20 отримували безпосередньо перед аналізом шляхом точного розбавлення вихідного розчину двічі дистильованою водою. Розчин підкисляли розбавленою хлоридною кислотою до рН 2,20.

Водневий показник вимірювали за допомогою рН-метра-мілівольметра 150 МА з точністю  $\pm 0,01$  од. рН.

Розчин  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л метиленового синього виготовляли шляхом розчинення 0,1599 г наважки у 100,00 мл двічі дистильованої води. Розчин з концентрацією  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л МС отримували щоденно шляхом точного розбавлення вихідного розчину водою.

Температуру  $30 \pm 0,5^\circ C$  підтримували за допомогою термостату ТС-80 та термостатованого пристрою.

Оптичну густину розчинів вимірювали на спектрофотометрі «UNICO SPECTRO QUEST 2800» (Японія) у кварцовій кюветі завтовшки 10 мм при 620 нм.

Використовували диференціальний варіант кінетичного методу; тангенс кута нахилу лінійних ділянок кінетичних кривих у координатах оптична густина – час характеризував швидкість реакції ( $tg\alpha$ ,  $хв^{-1}$ ).

## **Результати дослідження та їх обговорення**

За оптимальну було обрану концентрацію гліцину 0,02 моль/л (1,5 мг/л), яка дозволяла здійснювати достатню кількість вимірювань оптичної густини в часі на лінійній ділянці кінетичної кривої.

На рис. 1 наведено кінетичні криві залежності швидкості знебарвлення МС з розчином АК за наявності субстанції гліцину та додатково з додаванням солі купруму при рН 2,2. Як видно, додаванням купруму 6,35 нг/мл призводить до збільшення швидкості реакції у 1,2 разу.

За оптимальних умов перебігу індикаторної реакції нами опрацьована нова кінетична методика кількісного визначення домішок купруму у субстанції гліцину методом добавок.

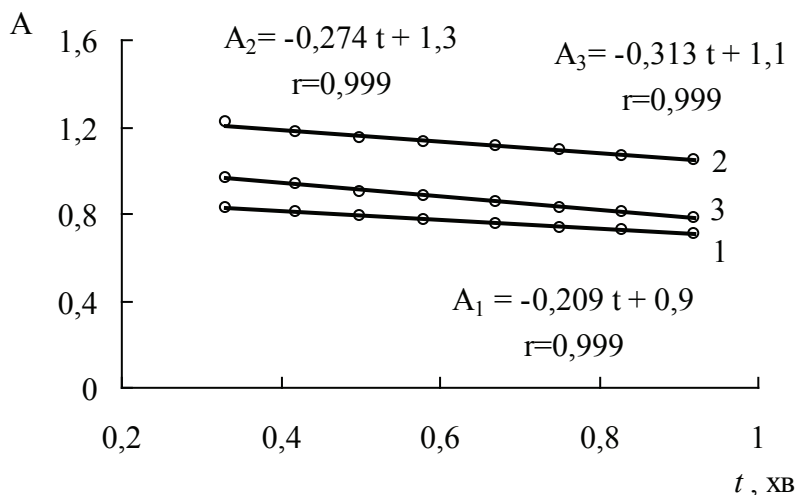


Рис. 1. Кінетична крива знебарвлення метиленового синього в реакції з АК:  
 1 – АК  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л; 2 – АК  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л з гліцином  $2 \cdot 10^{-2}$  моль/л;  
 3 – АК  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л з гліцином  $2 \cdot 10^{-2}$  моль/л та добавкою купруму 6,35 нг/мл;  
 $c(\text{МС}) = 5 \cdot 10^{-5}$  моль/л; рН 2,2

На рис. 2 наведено залежність  $\text{tg } \alpha$  кінетичних кривих у реакції АК з МС залежно від наважки гліцину. Як видно, умовна швидкість некаталітичної реакції становить  $0,208 \text{ хв}^{-1}$ , яка практично збігається з такою у «сліпому» досліді (за відсутності гліцину) (див. рис. 1). Можна зробити висновок про відсутність впливу матриці (гліцину) на каталітичну активність йонів купруму в індикаторній реакції за умов здійснення аналізу (рН 2,2).

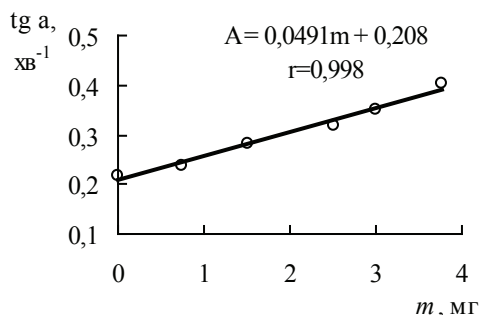


Рис. 2. Залежність умовної швидкості знебарвлення метиленового синього в індикаторній реакції з аскорбіновою кислотою від величини маси наважки субстанції гліцину.

$c(\text{АК}) = 5 \cdot 10^{-3}$  моль/л;  $c(\text{МС}) = 5 \cdot 10^{-5}$  моль/л; рН=2,20

*Методика кількісного визначення домішок купруму в субстанції «Гліцин»:* Близько 0,751 г (точна наважка) гліцину розчиняли в 100,00 мл двічі дистильованої води. Ретельно перемішували і переносили у термостат. Розчини термостатували впродовж 15–20 хв при температурі 30 °С. Концентрація – 0,1 моль/л.

До 0,50 мл розчину АК  $5 \cdot 10^{-2}$  моль/л додавали 1,00 мл  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л розчину МС, 2,00 мл 0,1 моль/л розчину субстанції гліцину і до 10,00 мл доводили двічі дистильованою водою, ретельно перемішували та вимірювали оптичну густину при 620 нм

у кварцовій кюветі на 1 см впродовж 2 хв з інтервалом кожних 5 с в автоматичному режимі (робочий дослід).

Аналогічно здійснювали дослід з додаванням 1,00 мл  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л стандартного розчину купруму (II). До 0,50 мл розчину АК  $5 \cdot 10^{-2}$  моль/л додавали 1,00 мл  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л розчину МС, 2,00 мл 0,1 моль/л розчину субстанції гліцину і доводили двічі дистильованою водою до 10,00 мл, ретельно перемішували та вимірювали оптичну густину при 620 нм на спектрофотометрі у кварцовій кюветі на 1 см впродовж 2 хв з інтервалом кожних 5 с в автоматичному режимі.

Для визначення швидкості некаталітичної реакції до 0,50 мл розчину АК  $5 \cdot 10^{-2}$  моль/л додавали 1,00 мл  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л розчину МС і доводили двічі дистильованою водою до 10,00 мл, ретельно перемішували та вимірювали оптичну густину при 620 нм у кварцовій кюветі на 1 см впродовж 2 хв з інтервалом кожних 5 с в автоматичному режимі.

За одержаними результатами знаходили тангенс кута нахилу лінійної ділянки кінетичних кривих,  $tg\alpha$ , у  $хв^{-1}$ . Тангенс кута нахилу кривої некаталітичної реакції знаходять за даними графічної залежності  $tg\alpha$  знебарвлення МС в індикаторній реакції від величини маси наважки субстанції гліцину,  $хв^{-1}$ .

Кількісний вміст купруму в гліцині розраховували за формулою:

$$C = \left[ \frac{C_1}{(tg\alpha_2 - tg\alpha_1)} \cdot (tg\alpha_1 - tg\alpha_3) \right] \cdot 1/m,$$

де:  $C$  – вміст купруму у субстанції АК, мкг/г;

$C_1$  – кінцева концентрація добавки купруму (II), г/л;

$tg\alpha_1$  – тангенс кута нахилу кінетичної кривої у робочому досліді з субстанцією гліцину,  $хв^{-1}$ ;

$tg\alpha_2$  – тангенс кута нахилу кінетичної кривої у досліді з субстанцією гліцину та добавкою купруму(II),  $хв^{-1}$ ;

$tg\alpha_3$  – тангенс кута нахилу кривої некаталітичної реакції,  $хв^{-1}$ ;

$m$  – маса наважки субстанції гліцину, г.

Т а б л и ц я

Результати кількісного визначення вмісту домішок купруму у субстанції гліцину ( $n=5$ ;  $P=0,95$ )

Назва препарату	Вміст купруму мкг/г	Метрологічні характеристики
Гліцин*	2,45	$\bar{X} = 2,46 \cdot \text{мкг/г}$ $\Delta X = 1,46 \cdot 10^{-7}$ $S = 1,2 \cdot 10^{-7}$ $S_{x(\text{cp})} = 5,27 \cdot 10^{-8}$ $RSD = 4,80\%$ $\varepsilon = 5,96\%$ $\delta = +1,99\%$
	2,44	
	2,65	
	2,42	
	2,32	

Примітка: вміст купруму, визначений хемілюмінесцентним методом добавок [7], становив 2,51 мкг/г.

Методом добавок встановлено, що вміст купруму у субстанції не перевищував допустимого значення ( $\leq 10$  ppm) – 2,46 мкг/г, причому RSD середнього результату  $\leq 4,80\%$ .

До переваг запропонованого нами каталітичного кінетико-спектрофотометричного методу, які вигідно відрізняють його від візуального напівкількісного тіоацетамідного методу, варто віднести вищу чутливість, відсутність потреби мінералізації досліджуваного зразка, доступність використовуваної апаратури та реактивів, а також простоту та швидкість здійснення аналізу.

## В и с н о в к и

Опрацьовано нову кінетико-спектрофотометричну методику кількісного визначення домішок купруму у субстанції лікарської речовини гліцину. Вміст купруму становив 2,46 мкг/г (RSD=4,80%) і добре узгоджувався з середнім значенням, знайденим методом хемільюмінесценції ( $\delta=+1,99\%$ ).

1. Аналитическая химия. Лабораторный практикум: учебное пособие для вузов / В.П.Васильев, Р.П.Морозова, Л.А.Кочергина: под ред. В.П.Васильева. – 3-е изд., стереотип. – М.: Дрофа, 2006. – 414 с.

2. Державна фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.

3. Кузнецов Н.Т. Комплексные соединения. Методическое пособие / Н.Т.Кузнецов, Б.Д.Стёпин, Л.Ю.Аликберова, Н.С. Рукк. – М., МИТХТ. – 2002. – 150 с.

4. Машиковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. Т.1. / М.Д.Машиковский. – 14-е изд., перераб., испр. И доп. – М.:ООО «Изд. Новая волна»: Издатель С.Б.Дивов. – 2002. – 540 с

5. Северина Е.С. Биохимия / Е.С.Северина – М. : Изд-во «ГЭОТАР - МЕД», 2003. – 779 стр.

6. Khan M.N. // Analytical sciences. – 2001. – Vol. 17. – P. 1195–1197.

7. Xiaoyan Z., Xiaodong F., Xiaoli Liu, Jianqiang Du // Chem. J. Internet. – 2002. – V. 4, № 11. – P. 52. <http://web.chemistrymag.org/cji/2002>.

Надійшла до редакції 22.11.2011.

*Н.Е.Блажеевский, И.Н.Боровская*

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСИ МЕДИ В СУБСТАНЦИИ ГЛИЦИНА

**Ключевые слова:** глицин, аскорбиновая кислота, метиленовый синий, каталитический кинетический метод, определение примеси меди

Предложена селективная кинетико-спектрофотометрическая методика количественного определения примеси меди в субстанции глицина, основанная на индикаторной реакции каталитического окисления аскорбиновой кислоты метиленовым синим. Показана возможность избирательного определения примеси меди в субстанции глицина.

*M. Ye. Blazheevskiy, I. N. Borovskaya*

## DETERMINATION OF COPPER IMPURITIES IN THE SUBSTANCE OF GLYCINE

**Keywords:** glycine, ascorbic acid, methylene blue, the catalytic kinetic method, determination of copper impurities.

## S U M M A R Y

A selective kinetic-spectrophotometric procedure of quantitative determination of copper impurities in the substance of glycine, which is based on the indicator catalytic reaction of ascorbic acid oxidation by methylene blue. The possibility of selective determination of copper impurities in the drug substance of glycine was shown.