

Рекомендована д.ф.н., професором П.Д.Пашнєвим

УДК 615.453.43:615.21:577.175.62:638.135:577.112.385.2

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ У КАПСУЛАХ “АПІНІН” МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИНОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

К.П.Ромась, О.І.Тихонов

Національний фармацевтичний університет

Проведені дослідження з розробки методики якісного та кількісного визначення аргініну у капсулах “Апінін” методом ВЕРХ. Стандартизовано умови хроматографічного виділення вказаної речовини зі зразків препарату. Розроблена методика характеризується достатньою простою, швидкістю, високою селективністю і може бути використана для контролю якості лікарського засобу.

На сьогоднішній день у медичній практиці велика увага приділяється використанню амінокислот завдяки їх широкому спектру фармакологічної дії та здатності посилювати засвоєння інших біологічно активних речовин [6, 11].

Амінокислоти — це клас органічних сполук, які об’єднують у собі властивості кислот та амінів та відіграють важливу роль в організмі людини. Препарати на основі амінокислот характеризуються нешкідливістю, малою вираженістю побічних ефектів і відсутністю алергічних реакцій [5, 7].

На основі амінокислот сучасна фармацевтична промисловість випускає досить велику кількість лікарських препаратів, які діють на клітинному рівні, а саме нормалізують трансдермальний транспорт іонів натрію та кальцію, видаляють надлишок останнього із організму, підвищують рівень γ-аміномасляної кислоти, стимулюють реполяризацію нейронів, підвищують рівень дофаміну. Але щодо амінокислотних препаратів вітчизняного виробництва, то аналіз асортименту свідчить про недостатню їх кількість [8, 9].

Відомо [7, 12], що певні амінокислоти мають специфічну фармакодинаміку. Наприклад, при серцево-судинних захворюваннях та порушеннях роботи ЦНС застосовують пролін, триптофан, цистеїн, фенілаланін, аспарагін, γ-аміномасляну кислоту, гліцин; при захворюваннях опорно-рухового апарату та порушеннях регенерації пошкоджених тканин шкіри та м’язів з успіхом використовують лейцин, лізин, метіонін, цистеїн; при порушеннях функції печінки та жирового обміну корисними є

треонін та серин. Аргінін і цистеїн використовують завдяки їх здатності уповільнювати ріст пухлин, тирозин застосовують при синдромі хронічної втоми.

Існує велика кількість досліджень [11, 13], присвячена аргініну, який був вперше виділений у 1886 р. E.Schuzle та E.Steiger, а його структура встановлена E.Schuzle та E.Winterstein у 1897 р. Аргінін слугує необхідним попередником для синтезу багатьох біологічно активних речовин, таких як орнітин, пролін, поліаміни, креатин та агматин.

Лише нещодавно була встановлена виключна роль аргініну в якості єдиного джерела оксиду азоту (NO) як однієї з найважливіших сигнальних молекул усіх тканин організму [4, 6, 12]. За рахунок здатності утворювати оксид азоту в процесі окиснення в організмі аргінін володіє широким спектром регуляторного впливу на метаболічні процеси, а саме: покращує еректильну функцію чоловіків, бере участь у сперматогенезі, збільшує швидкість загоювання ран, переломів кісток, позитивно впливає на редукцію патології сполучної тканини, на роботу залоз внутрішньої секреції, підшлункової залози та гіпофізу; володіє антигіпоксичною, мембрanoстабілізуючою, цитопротекторною та антиоксидантною фармакологічними діями [2, 4, 6].

Тому нами для лікування еректильної дисфункциї та безпліддя у чоловіків запропоновано наступний склад капсул “Апінін”: аргініну у переважну частину на 100% речовини — 316 мг та фенольного гідрофобного препарату прополісу (ФГПП) — 50 мг, в якості допоміжних речовин до складу препарату введено діоксид кремнію колоїдний безводний, кальцію стеарат, магнію карбонат основний легкий та лактози моногідрат модифікований [8].

Для якісного та кількісного аналізу амінокислот застосовують амінокислотні аналізатори, спектрофотометричне визначення в УФ та ІЧ області, хроматографію на папері, хроматографію у тонкому шарі сорбенту, газорідинну хроматографію, неводне потенціометричне титрування, а також

Таблиця 1
Програмування рухомої фази

Час, хв	Вміст рухомої фази "А", %	Вміст рухомої фази "Б", %
0-5	100	0
5-20	100-10	0-90
20-25	10	90
25-26	10-100	90-10
26-30	100	0

метод високоефективної рідинної хроматографії тощо [1, 5].

Відомо, що контроль якості багатокомпонентних лікарських препаратів можливий при використанні високоселективних аналітичних методів, одним із яких є ВЕРХ. Даний метод широко застосовується для проведення ідентифікації, кількісного визначення, фармакокінетичних досліджень амінокислот завдяки швидкості, зручності, доступності, високої селективності, точності та чутливості [9, 10].

Метою нашої роботи є розробка методики якісного та кількісного аналізу аргініну в капсулах "Апінін" з використанням методу ВЕРХ.

Матеріали та методи

Об'єкти дослідження

В якості об'єктів досліджень були використані зразки капсул "Апінін", зразки капсульної суміші без вмісту аргініну та субстанція аргініну (SynEx Pharma Technologies Co., Ltd, Китай), що відповідає вимогам [14].

Хроматографічні умови

Кількісне визначення аргініну у препараті проводили на високоефективному рідинному хроматографі фірми "Gilston" (Франція) з подальшою комп'ютерною обробкою результатів дослідження за допомогою програми "МультіХром" для "Windows".

Для проведення дослідження була обрана хроматографічна колонка розміром 150×2,0 мм, заповнена сорбентом "Reprosil-Pur C18-AQ" із розміром часток 3 мкм. Для роботи використовували мірний посуд класу А.

В якості рухомої фази використано фосфатний буферний розчин 0,1 М натрію дигідрофосфату, доведений до pH 2,5 за допомогою фосфорної кислоти та ацетонітрилу. Рухома фаза "А" була представлена сумішшю фосфатного буферного розчину (pH 2,5) та ацетонітрилу у співвідношенні 90:10, рухома фаза "Б" — вказаною сумішшю у співвідношенні 15:85.

Використовували таку програму рухомої фази (табл. 1).

Швидкість рухомої фази складала 0,4 мл/хв. Дослідження проводили при температурі колонки +40°C та при довжині хвилі детектування 370 нм.

Приготування робочого розчину стандартного зразка (РСЗ)

Близько 0,32 г (точна наважка) стандартного зразка (СЗ) аргініну поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 40 мл 0,05 М розчину натрію тетраборату, перемішують до повного розчинення СЗ аргініну, доводять до мітки тим же розчинником та перемішують.

Беруть 5,0 мл отриманого розчину і поміщають у колбу місткістю 50 мл, додають 25,0 мл 0,05 М розчину натрію тетраборату, 2,0 мл 10% розчину 1-фтор-2,4-динітробензолу, витримують протягом 40 хв при температурі 40°C та охолоджують до кімнатної температури. Отриманий розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 50 мл, доводять об'єм розчину рухомою фазою "А" до мітки, перемішують та фільтрують крізь фторопластовий фільтр з розміром пор не більше 0,5 мкм.

Приготування робочого розчину досліджуваного зразка (РДЗ) та робочого розчину досліджуваного зразка без вмісту аргініну проводили за наведеною вище методикою, використовуючи наважки зразків масою 0,4 г та 0,08 г відповідно.

Хроматографування розчину порівняння аргініну та випробуваних розчинів проводили не менше 3 разів до тих пір, поки не виконувались вимоги до придатності хроматографічної системи.

Результати та їх обговорення

На рис. 1, 2 і 3 представлені хроматограми розчинів досліджуваного препарату, стандартного зразка аргініну та розчину досліджуваного препарату без вмісту аргініну відповідно.

Придатність хроматографічної системи перевіряли за наступних умов:

- ступінь розділення піку динітрофенол похідного аргініну та найближчого до нього піку повинен бути не менше 1,5;
- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком динітрофенол похідного аргініну, повинна бути не менше 50000 теоретичних тарілок;

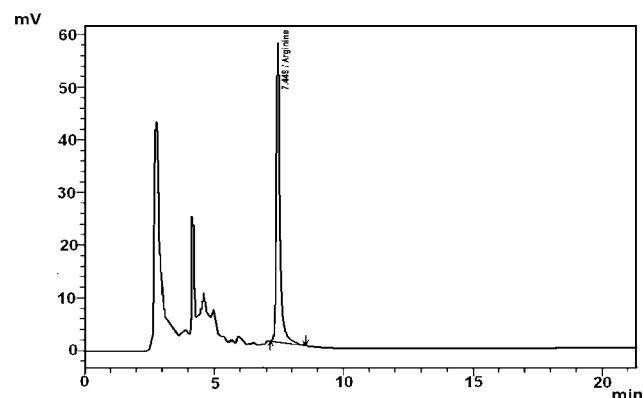


Рис. 1. Хроматограма досліджуваного розчину капсул "Апінін".

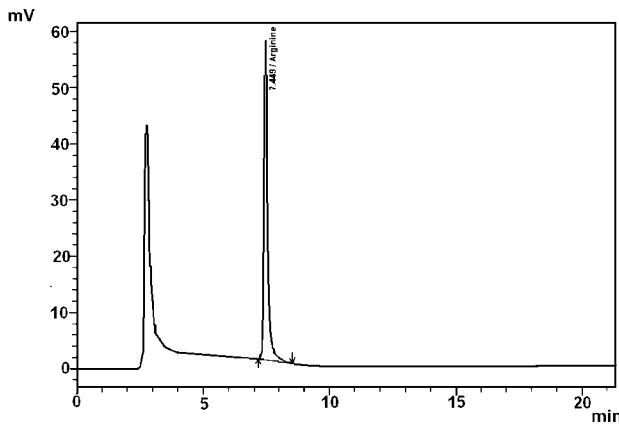


Рис. 2. Хроматограма розчину стандартного зразка субстанції аргініну.

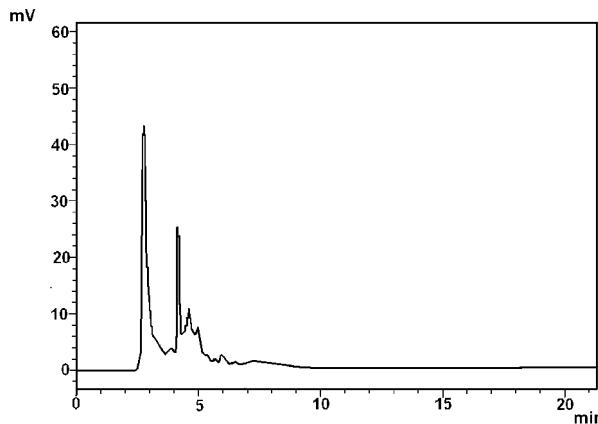


Рис. 3. Хроматограма розчину капсульної суміші без вмісту аргініну.

- відносне стандартне відхилення, розраховане для площин піків динітрофеніл похідного аргініну, повинне відповідати ДФУ 1 вид., 2.2.29;
- коєфіцієнт асиметрії, розрахований за піком динітрофеніл похідного аргініну, повинен складати від 0,8 до 1,8.

Коефіцієнт асиметрії піку (T) розраховували за формулою (1):

$$T = \frac{\mu 0.05}{2 \times f}, \quad (1)$$

де: $\mu 0.05$ — ширина піку на висоті 5% від базової лінії, мм; f — відстань від початку піку на висоті 5% від базової лінії до перпендикуляру, проведеної з його вершини, мм.

Як видно з представлених хроматограм, хроматографічна система відповідає вимогам придатності, а саме:

1) пік динітрофеніл похідного аргініну добре відділяється від системного піку та піків основи препарату (рис. 1, 3);

2) ефективність хроматографічної колонки, розрахована для піку динітрофеніл похідного аргініну, складає 119213 теоретичних тарілок;

3) коефіцієнт асиметрії піку динітрофеніл похідного аргініну складає 1,502.

Вміст аргініну (X) у грамах на одну капсулу розраховували за наступною формулою (2):

$$X = \frac{S \times m_0 \times 5 \times 50 \times 50 \times P \times (100 - W) \times b}{S_0 \times m \times 5 \times 50 \times 50 \times 100 \times 100} = \\ = \frac{S \times m_0 \times P \times (100 - W) \times b}{S_0 \times m \times 100 \times 100}, \quad (2)$$

де: S — середнє значення площ піків динітрофеніл похідного аргініну, розраховане за хроматограмами досліджуваного розчину, мм^2 ; S_0 — середнє значення площ піків динітрофеніл похідного аргініну, розраховане за хроматограмами розчину порівняння аргініну, мм^2 ; m_0 — маса наважки СЗ аргініну,

Таблиця 2

Метрологічні характеристики кількісного визначення аргініну у капсулах “Апінін” (серія 20211)

Наважка, г	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
0,3890	0,3073	$\bar{X} = 0,3104$ $S = 0,001266728$ $S_x = 0,000008023$ $\Delta x = 0,0040$ $\varepsilon = 1,13\%$ $\bar{X} \pm \Delta x = 0,3104 \pm 0,0040$
0,3961	0,3129	
0,3972	0,3138	
0,3906	0,3086	
0,3914	0,3092	

Примітка. Кількість вимірювань $n = 5$, $P = 95\%$.

використаної для приготування РСЗ, г; m — маса наважки ДЗ препарату, використаної для приготування РДЗ, г; b — середня маса вмісту капсули, г; P — ступінь чистоти стандартної речовини, %; W — втрата в масі при висушуванні СЗ аргініну, %.

Допустиме відхилення для вмісту $C_6H_{14}N_4O_2$ (аргиніну) в одній капсулі препарату “Апінін” дорівнює $\pm 5\%$ [3], тобто вміст вказаної субстанції в одній капсулі, у перерахунку на середню масу капсули, має складати відповідно від 0,3002 г до 0,3318 г.

Результати кількісного визначення аргініну у складі капсул “Апінін” за методом ВЕРХ представлені в табл. 2.

Як видно з табл. 2, кількісний вміст аргініну у препараті знаходиться у допустимих межах. За даними статистичної обробки результатів встановлено допуски нормування вказаної активної речовини у препараті.

ВИСНОВКИ

1. Розроблена методика якісного та кількісного визначення аргініну методом ВЕРХ у капсулах “Апінін”.

2. Методика характеризується достатньою пристою і може бути використана для контролю якості лікарського засобу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гармонов С.Ю., Захаров И.М., Юсупова Л.М. та ін. // Вопр. биол., мед. и фармац. химии. — 2007. — №1. — С. 13-15.
2. Гуревич М.А., Струров Н.В. // Трудный пациент. — 2006. — №3. — С. 23-29.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. — 1-е вид. — Х.: РІПЕГ, 2001. — 556 с.
4. Закуцкий А.Н., Субботина Т.Ф. // Вопр. биол. мед. этики и фармац. химии. — 2005. — №1. — С. 7-12.
5. Маштамер В.В., Гонтова Т.М., Хворост О.П. // Укр. журн. клін. та лабораторної медицини. — 2009. — №2. — С. 70-72.
6. Степанов Ю.М., Кононов И.Н., Журбіна А.І. та ін. // Журн. АМН України. — 2004. — Т. 10, №2. — С. 339-351.
7. Тихонов О.І., Олійник С.В., Чущенко В.М. // Вісник фармації. — 2009. — №2 (58). — С. 46-51.
8. Тихонов О.І., Ромась К.П. // Фармац. журн. — 2009. — №5. — С. 87-93.
9. Харченко О.В., Алмакаєва Л.Г., Шейн А.Т. та ін. // Фармац. журн. — 2007. — №1. — С. 59-63.
10. Чорнобровкін М.Г., Ананьєва І.А., Шаповалова Е.Н. та ін. // Журн. аналіт. хімії. — 2004. — Т. 59, №1. — С. 69-72.
11. Boger R.H. // J. Nutr. — 2007. — Vol. 137. — P. 1650-1655.
12. Bryan N.S., Bian K., Murad F. // Frontiers in Biosci. — 2009. — Vol. 14. — P. 1-18.
13. Gornik H.L., Creager M.A. // J. Nutr. — 2004. — Vol. 134. — P. 2880-2887.
14. The United States Pharmacopeia. — USP 33 NF 28 — The US Pharmacopeia Rockville. Convention, 2009. — Vol. 2. — P. 1222-1223.

УДК 615.453.43:615.21:577.175.62:638.135:577.112.385.2
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРГИНИНА В
КАПСУЛАХ “АПИНИН” МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕК-
ТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Е.П.Ромась, А.И.Тихонов

Проведены исследования по разработке методики качественно-го и количественного определения аргинина в капсулах “Апи-нин” методом ВЖХ. Стандартизированы условия хроматографического выделения указанного вещества из образцов препарата. Разработанная методика характеризуется достаточной простотой, быстротой, высокой селективностью и может быть использована для контроля качества лекарственных средств.

UDC 615.453.43:615.21:577.175.62:638.135:577.112.385.2
ASSAY OF ARGinine IN “APININ” CAPSULES BY THE
HPLC METHOD

K.P.Romas, O.I.Tikhonov

The research in developing of the qualitative and quantitative methods of determination of arginine by HPLC in “Apinin” capsules have been conducted. The conditions of chromatographic isolation of the substance from the drug samples have been standardized. The method developed is simple, quick, highly selective and can be used for the quality control of medicines.