

**РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛІЗОЦИМУ
ГІДРОХЛОРИДУ У СКЛАДІ СТОМАТОЛОГІЧНОГО ГЕЛЮ**

**DEVELOPMENT OF METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF
LYSOCIM HYDROCHLORIDE IN THE DENTAL GEL**

Синьова Т.О., Грудько В.О.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна.

Анотація. В даній статті представлена розробка методики кількісного визначення лізоциму гідрохлориду у складі 0,3% стоматологічного гелю методом спектрофотометрії.

Ключові слова: Лізоцим, спектрофотометрія, амінокислоти, гель, нінгідрин.

Abstract. This article presents the development of a method for quantitative determination of lysozyme hydrochloride in 0.3% of dental gel by spectrophotometry.

Key words: Lysozyme, spectrophotometry, amino acids, gel, ninhydrin.

Вступ. Понад 90% людей зустрічаються із запальними захворюваннями пародонту [1]. Для їх лікування на кафедрі заводської технології ліків НФаУ, був розроблений стоматологічний гель на основі антибактеріальної сполуки – лізоциму [2]. У складі лізоциму було визначено 129 амінокислот [3], завдяки чому він може вступати в реакцію конденсації з нінгідрином, продукт якої забарвлений у фіолетовий колір. На основі цієї реакції ми розробили методику спектрофотометричного аналізу на видимій ділянці спектру.

Мета дослідження. Розробка методики кількісного визначення лізоциму гідрохлориду у складі стоматологічного гелю методом спектрофотометрії.

Матеріали та методи. Об'єкт дослідження – 0,3% стоматологічний гель на основі лізоциму. Вміст лізоциму визначали спектрофотометрично за продуктами взаємодії з нінгідрином.

Отримані результати. Лізоцим – білок, тому ми використали реакцію з нінгідрином для його кількісного визначення в 0,3% стоматологічному гелі. [4]

Приготування фосфатного буферного розчину з рН 6,8: 3,40 г калію дигідрофосфату помістили в мірну колбу ємністю 100 мл, додали 3,55 г динатрію гідрофосфату, 70 мл дистильованої води, перемішали до розчинення, довели до мітки тим самим розчинником і перемішали.

Приготування реагенту: розчинили 1,0 нінгідрину в 50 мл фосфатного буферного розчину з рН 6,8.

Приготування розчину стандартного зразка лізоциму (розчин С3): 0,1004 г стандартного зразка (С3) лізоциму гідрохлориду помістили в мірну колбу ємністю 25 мл, додали 15 мл дистильованої води, перемішали до розчинення, довели до мітки тим же розчинником і перемішали.

Для кількісного визначення лізоциму використовується спектрофотометрія в ультрафіолетовій та видимій області спектру. Оскільки до складу гелю входить консервант натрію бензоат, його спектр поглинання накладається на спектр поглинання ароматичних амінокислот лізоциму і завищує результати. Щоб цьому запобігти, ми вирішили провести реакцію

з нінгідрином для розчину СЗ і для 0,3% гелю з лізоцимом і визначити вміст лізоциму за специфічним продуктом реакції.

Хід реакції 1: До 1 мл розчину СЗ додали 2 мл реагенту та 1 мл води. Перемішали, нагріли на водяному огрівнику при 80°C протягом 5 хвилин. Спостерігали мутний розчин фіолетового кольору, що не розшаровується при центрифугуванні (15 хв при 15000 об/хв). При температурі 65°C приблизно 55% лізоциму денатурує, тому ми використали бутанол для екстракції забарвленого продукту взаємодії лізоциму з нінгідрином. До утвореного продукту реакції 1 додали 15 мл бутанолу за допомогою мірної піпетки. Ретельно струшували для проведення екстракції та залишили відстоюватися на 10 хв. Спектр бутанольного екстракту знімали на спектрофотометрі Evolution 60S в кюветах з товщиною шару 10 мм в межах 350-700 нм. Як контрольний розчин використали бутанол (рис. 1, Лізоцим СЗ). У спектрі спостерігається широка інтенсивна смуга з максимумом при довжині хвилі 571 нм, яка лежить в

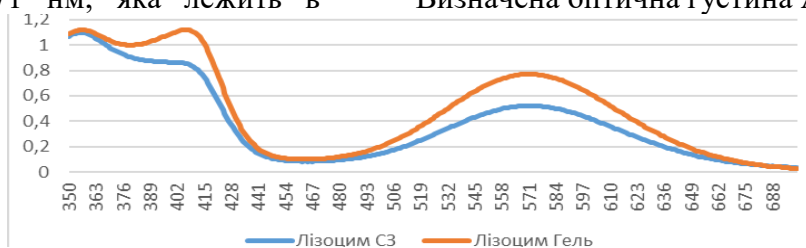


Рис.1. Адсорбційні спекти розчинів, отриманих при взаємодії СЗ та 0,3% гелю лізоциму гідрохлориду з нінгідрином.

Таким чином в спектрах обох екстрактів є широка інтенсивна смуга вбирання з максимумом при 571 нм яка може бути використана як аналітична смуги поглинання для кількісного визначення лізоциму гідрохлориду.

Підпорядкування закону Бугера-Ламберта-Бера. Обов'язковою умовою спектрофотометричного визначення є перевірка підпорядкування поглинання світла закону Бугера-Ламберта-Бера. Вона зводиться до побудови графіка залежності оптичної густини А від концентрації розчину. Світлопоглинання розчинів підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера тільки в межах

області поглинання спектру фіолетового кольору. Визначена оптична густина Аст – 0,522.

Хід реакції 2: у хімічну склянку помістили 2,0202 г 0,3% стоматологічного гелю лізоциму гідрохлориду, додали 2 мл реагенту, перемішали і нагріли на водяному огрівнику від 70°C до 80°C протягом 5 хв. Охолодили протягом 5 хв. Спостерігали мутний розчин фіолетового кольору. Перенесли у мірну колбу ємністю 25 мл. Склянку ополіскували порціями 3 мл і 2 мл води, зливаючи в ту саму мірну колбу. За допомогою мірної піпетки додали 15 мл бутанолу, струшуючи для проведення екстракції. Довели до 25 мл водою, перемішали. Залишили відстоюватися на 10 хв. Мутний бутанольний шар відцентрифугували при 8000 об/хв протягом 5 хв. Спектр центрифугату знімали в аналогічних умовах (рис. 1, Лізоцим Гель). Аналіз отриманого спектру показує, що в ньому також спостерігається широка інтенсивна смуга з максимумом при довжині хвилі 571 нм. Визначена оптична густина А – 0,771.

концентрацій, в яких оптична густина прямо залежить від концентрації розчину і градуїрована крива являє собою пряму лінію (рис. 2) [5]. Нами було вивчено залежність оптичної густини від кількості лізоциму гідрохлориду в пробі в умовах експерименту при його взаємодії з нінгідрином в присутності фосфатного буферного розчину з наступною екстракцією бутанолом.

Побудова градуювального графіку. 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; мл розчину СЗ лізоциму гідрохлориду поміщали в пробірку, додали 2 мл реагенту, перемішали, додали 1,25; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25; 0; мл води. Далі 6 пробірок

нагрівали на водяному огрівнику при температурі 80° протягом 5 хвилин та переливали у мірні колби ємністю 25 мл. Пробірки ополіскували 3 мл, а потім 2 мл води, зливаючи у ту саму мірну колбу. Потім у кожну колбу за допомогою мірної піпетки додали 15 мл бутанолу, довели водою до мітки і ретельно струшували колби для проведення

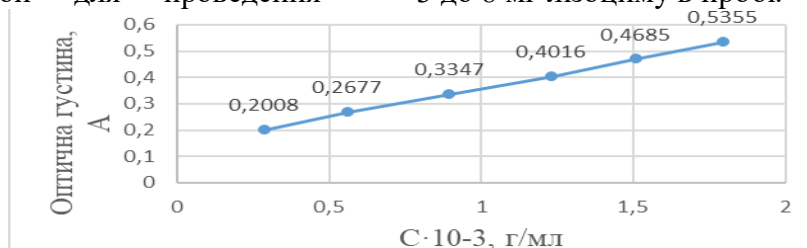


Рис. 2. Градувальний графік залежності оптичної густини бутанольних екстрактів, отриманих при взаємодії СЗ лізоциму гідрохлориду з нінгідрином від кількості лізоциму в пробі.

За розробленою методикою проведено кількісне визначення лізоциму у складі зразка 0,3% стоматологічного гелю. Вміст лізоциму розраховували за формулою:

$$X_{г/г} = \frac{A \times V_1 \times m_{ст} \times V_{2ст}}{A_{ст} \times m_{н} \times V_{1ст} \times V_{3ст}} ;$$

$$X_{г/г} = \frac{0,771 \times 15 \times 0,1004 \times 1}{0,522 \times 2,0202 \times 25 \times 15} = 0,00294 \text{ г/г}$$

Висновки: Досліджено взаємодію лізоциму гідрохлориду з нінгідрином в середовищі фосфатного буферного розчину з рН 6,8. Встановлено, що продукт реакції добре екстрагується бутанолом, а абсорбційний спектр екстракту містить шороку інтенсивну смугу вбирання з λ_{\max} 571 нм, придатну для проведення кількісного визначення. Світлопоглинання екстрактів підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера при вмісті від 3 до 8 мг лізоциму в пробі. За розробленою методикою проведено кількісне визначення лізоциму у складі зразка 0,3% стоматологічного гелю. Вміст лізоциму гідрохлориду у складі гелю 0,00294 г/г.

Список літератури

екстракції. Оптичну густина А отриманих бутанольних екстрактів визначали на спектрофотометрі Evolution 60 S в кюветах з товщиною шару 10 мм при довжині хвилі 571 нм. В якості контрольного розчину використовували бутанол. Отримані дані представлені на рисунку 2. Графік лінійний при вмісті від 3 до 8 мг лізоциму в пробі.

1. Нові можливості місцевої антибактеріальної терапії запальних захворювань пародонту / Ю.С. Маслій, О.А. Рубан / 2011.

2. Дослідження з метою розробки м'якої лікарської форми з лізоцимом для застосування у стоматології / О. А. Рубан, Акрам Ель Гуедрор, Ю. С. Маслій, Н. С. Кавушевська // Збірник наукових праць співробітників НМАПО - Вип. 23, кн. 4. – 2014. – С. 373-380.

3. Ross Feldberg, Dept. of Biology, Tufts University. Structure and Function in Lysozyme. Електронний ресурс. – Режим доступу: <https://ase.tufts.edu/biology/molecvisual/bio152/rightlyso.html#Introlysozyme>

4. Lysozyme Hydrochloride / The Japanese Pharmacopoeia the 17th Edition. P. 1181.

5. Разработка методики количественного определения глюкозамина / Ламгири А., Таран С. Г. / Харьков 2010. С. 25

Відомості про авторів / Information about the Authors

Синьова Тетяна Олександрівна, студентка 4 курсу Національного фармацевтичного університету, м. Харків, Україна

Synova Tetyana, student National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

e-mail: pharmacy.synova@gmail.com

Грудько Володимир Олексійович, кандидат фармацевтичних наук, доцент кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, м. Харків, Україна
Grudko Volodymyr, PhD of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry of the National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine
e-mail: 431230@ukr.net