

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИЦИНА И КИСЛОТЫ ЯНТАРНОЙ В ТАБЛЕТКАХ НООТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Крылов Н. Н., Сенченко С. П., Компанцева Е. В., Шевченко А. М.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, Россия (357532 Ставропольский край, г.Пятигорск пр-кт Калинина, 11), n.n.krylov@mail.ru

Представлены результаты по разработке методики качественного и количественного определения глицина и кислоты янтарной при совместном присутствии в препарате «Гинкготропил-форте», экспериментальной серии, методом капиллярного электрофореза. Определены оптимальные условия определения данных веществ: ведущий электролит – боратный буфер с pH 9, температура 30°C, давление 10 мБар. Рабочие параметры: кварцевый капилляр диаметром 75 мкм, общей длиной 60 см и эффективной длиной 50 см, напряжение +20 кВ, детектирование при 200 нм. В указанных условиях было достигнуто оптимальное разделение определяемых веществ с другими компонентами препарата. Проведенная статистическая обработка результатов качественного и количественного определения глицина и кислоты янтарной в препарате «Гинкготропил-форте» показала, что RSD результатов определения времен миграции составило 0,52 % и 2,56 %, RSD результатов количественного определения 0,77 % и 3,79 % для глицина и кислоты янтарной, соответственно.

Ключевые слова: глицин, кислота янтарная, капиллярный электрофорез.

DEVELOPMENT OF TECHNIQUES DEFINITIONS GLYCINE AND SUCCINIC ACID IN TABLETS NOOTROPIC ACTION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Krylov N. N., Senchenko S. P., Kompantseva E. V., Shevchenko M. A.

Pyatigorsk medico-pharmaceutical institute – branch to Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia (357532 Stavropol region, Pyatigorsk, st. Kalinin, 11), n.n.krylov@mail.ru

The results of the development of techniques of qualitative and quantitative determination of glycine and succinic acid at a joint presence in the preparation "Ginkgotropil forte" experimental series, by capillary electrophoresis. The optimal conditions for determination of these substances: Leading electrolyte – borate buffer at pH 9, 30 ° C, pressure of 10 mBar. Operating parameters: silica capillary 75 μm in diameter, a total length of 60 cm and an effective length of 50 cm, voltage 20 kV, detection at 200 nm. Under these conditions, optimal separation was achieved analytes from other components of the formulation. Carrying out a statistical analysis of the results of qualitative and quantitative determination of glycine and succinic acid in the preparation "Ginkgotropil forte" showed that the RSD of results since the definition of migration was 0,52% and 2,56 %, RSD of the results of quantitative determination of 0,77 % and 3,79 % of succinic acid and glycine, respectively.

Keywords: glycine, succinic acid, capillary electrophoresis.

Острые нарушения мозгового кровообращения являются важнейшей медико-социальной проблемой. В России инсульт ежегодно развивается у 400–450 тысяч человек, примерно 200 тысяч погибают. В стране проживает более 1 миллиона человек, перенесших инсульт, причем 80 % из них являются инвалидами. Одним из направлений в лечении острых нарушений мозгового кровообращения является использование нейропротекторных препаратов, они же ноотропы [4]. Нами разрабатывается для этих целей препарат «Гинкготропил-форте», в состав которого входят глицин, кислота янтарная, сухие экстракты гинкго двулопастного и лабазника вязолистного [6].

Одной из задач при разработке нового лекарственного препарата является его стандартизация. Согласно существующим нормативным документам, количественное определение субстанции глицина проводят методом кислотно-основного титрования в неводных средах, кислоты янтарной – алкалиметрическим методом. Согласно имеющим литературным данным определение данных веществ при их совместном присутствии не описано. При разработке способов анализа лекарственных средств преимущественно используются физико-химические методы, к которым относится интенсивно развивающийся метод разделения сложных смесей – капиллярный электрофорез, позволяющий анализировать ионные и нейтральные компоненты различной природы с высокой экспрессностью и уникальной эффективностью [1,7]. На сегодняшний день известен ряд методик количественного определения глицина и кислоты янтарной методом капиллярного электрофореза, но методики их определения при совместном присутствии и в присутствии других компонентов отсутствуют.

С учетом химических свойств и значений pK_a глицина и кислоты янтарной для определения в условиях одного анализа целесообразно использовать ведущий электролит со значением $pH \geq 9$ и более, так как в этом случае оба компонента будут являться анионами и соответственно могут быть проанализированы в условиях капиллярного зонного электрофореза.

Известно, что 99,9 % ионизированной формы вещества находится при pH , превышающих pK_a на 3 единицы. Ввиду того, что pK_a глицина по карбоксильной группе имеет значение 2,31, а янтарной кислоты $pK_{a1} = 3,55$ и $pK_{a2} = 5,69$, то можно сказать, что при использовании буферного раствора с $pH = 9$ все карбоксильные группы заряжены будут по иону на 99,9 % [2].

pK_a глицина по алифатической аминогруппе составляет 9,71[2] и аминогруппа будет ионизирована на 99,9 % в растворах при pH менее 6,7. В выбранных условиях (буферный раствор с $pH = 9$) аминогруппа ионизирована только на 36,5 %, т.е. можно предположить, что в данном электролите будет преобладать анионная форма глицина.

Цель работы

Разработка методики качественного и количественного определения глицина и кислоты янтарной в таблетках ноотропного действия с применением капиллярного электрофореза.

Материалы и методы исследования

Для исследования использовали субстанции глицина с количественным содержанием 99,5 % (WIRUD®GL10001, производитель WIRUD GmbH, Германия), кислоты янтарной с содержанием 99,7 % (Huanlong Food Additives Corporation, Китай), а также образцы таблеток

разрабатываемого препарата ноотропного действия «Гинкготропил-форте» (экспериментальная серия от 27.11.14) [6]. Сухие экстракты гинкго двулопастного и лабазника вязолистного получены нами путем сгущения жидких экстрактов 1:2 на 70 % этаноле с последующей сушкой под вакуумом до влажности не выше 5 %, при температуре не выше 40 °С.

Работу проводили с использованием системы капиллярного электрофореза Капель 105 (группа компаний Льюэкс, Россия) с кварцевым капилляром диаметром 75 мкм, общей длиной 60 см и эффективной длиной 50 см. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при длине волны равной 200 нм в катодной области капилляра. Напряжение составляло +20 кВ, температура опыта 30°С. Ввод пробы осуществляли гидродинамически 150 мБар×с. Для подготовки капилляра и восстановления его поверхности проводили его последовательную промывку водой, 0,5 М раствором кислоты хлористоводородной, водой, 0,5 М раствором натрия гидроксида, водой и затем ведущим электролитом. В качестве ведущих электролитов в работе использовались 0,01 М боратные буферные растворы с рН 9 и 10 [3].

Также оценивалось влияние приложенного в режиме анализа давления на время миграции и эффективность исследуемых веществ, используя следующие режимы: 0, 10, 20, 30 мБар.

Методика: около 0,2 г (точная навеска) массы растертых таблеток помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в небольшом количестве воды очищенной до полного растворения, затем доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. 1 мл полученного раствора центрифугировали в течении 5 минут при 8000мин⁻¹ и подвергали анализу, прикладывая по ходу эксперимента давление 10 мБар. Параллельно вводили пробы растворов стандартных образцов глицина и кислоты янтарной. Расчет содержания глицина и кислоты янтарной проводили по формуле:

$$X_{\Gamma} = \frac{S_x \times a_{\text{ст}} \times P}{S_{\text{ст}} \times a_x} \times \frac{W_1 V_{a2}}{V_{a1} W_2}, \text{ где}$$

S_x – площадь исследуемого вещества;

$S_{\text{ст}}$ – площадь стандартного образца;

$a_{\text{ст}}$ – навеска стандартного образца, взятого для анализа, г;

a_x – навеска испытуемого образца, взятого для анализа, г;

P – средняя масса таблеток, г;

$W_{1,2}$ – объем мерной колбы, используемые для приготовления растворов, мл;

$V_{a1,2}$ – объем аликвоты, взятой для анализа, мл.

Приготовление растворов стандартных образцов. Точные навески глицина (около 0,1000 г), кислоты янтарной (около 0,0200 г) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и далее поступали как описано в вышеприведенной методике. Смесь кислот готовили из полученных растворов, смешивая их в одинаковой пропорции и подвергали анализу.

Приготовление модельных смесей таблеток

Модельная смесь таблеток состоит из глицина (около 0,1000 г), кислоты янтарной (около 0,0200 г), экстракта гинкго двулопастного сухого (около 0,0300 г), экстракта лабазника вязолистного сухого (около 0,0300 г), аспасвита (около 0,0040 г), полипладсон XL 10 (около 0,0260 г), кальция стеарата (около 0,0020 г), коллидона 90 (около 0,0025 г).

Модельная смесь таблеток без глицина и кислоты янтарной состоит из компонентов, представленных выше, за исключением глицина и кислоты янтарной соответственно.

Результаты исследований и их обсуждение

В ходе эксперимента было установлено, что электролит с рН 9 является оптимальным для анализа компонентов. Время миграции глицина составляет 4,5 минуты, кислоты янтарной – 12 минут (рис.1). Увеличение рН электролита до 10 нецелесообразно в связи со значительным увеличением времени миграции янтарной кислоты (при рН 10 время миграции составляет 19 минут), а также потерей эффективности анализируемых веществ (табл.1) [3].

В предложенных условиях был проанализирован раствор смеси СОглицина и кислоты янтарной при совместном присутствии.

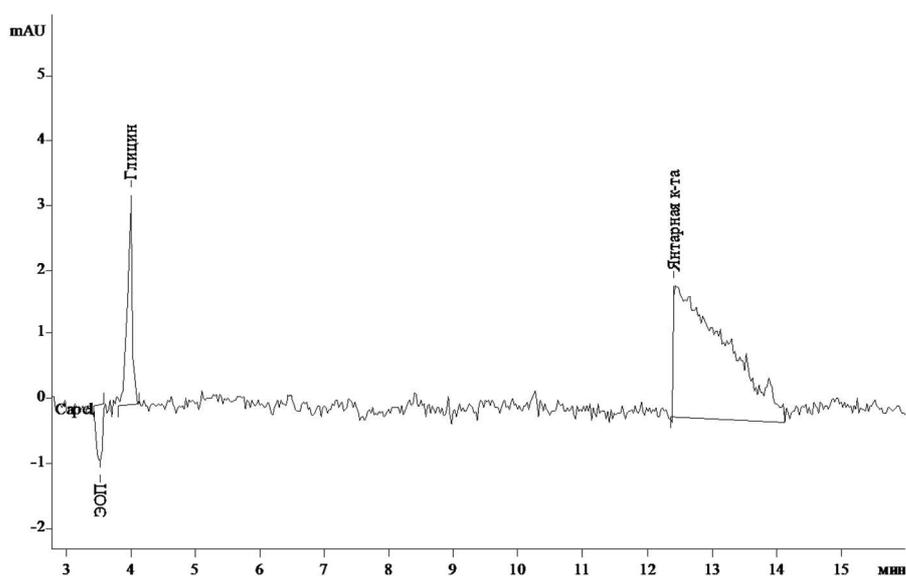


Рис.1. Электрофореграмма раствора глицина и кислоты янтарной

Далее в разработанных условиях было изучено влияние режима давления в процессе анализа на время миграции и эффективность глицина и кислоты янтарной при совместном присутствии (табл. 1).

Как следует из таблицы 1 в качестве оптимального, следует использовать давление равное 10 мБар, обеспечивающее наилучшие параметры эффективности при приемлемых значениях времени миграции веществ.

Таблица 1

Выбор оптимальных условий анализа глицина и кислоты янтарной при совместном присутствии

Условия анализа	Глицин		Кислота янтарная	
	t, мин.	N	t, мин.	N
Боратный буферный раствор (pH = 9,0)	4,42	10241	12,10	2450
Боратный буферный раствор (pH = 10)	5,12	2192	18,87	1914
Боратный буферный раствор (pH = 9,0 + 10 мБар)	3,5	12040	8,92	14669
Боратный буферный раствор (pH = 9,0 + 20 мБар)	3,1	14390	6,38	9308
Боратный буферный раствор (pH = 9,0 + 30 мБар)	2,53	12012	5,03	6173

Предварительно на модельной смеси таблеток изучили влияние биологически активных соединений сухих экстрактов гинкго двулопастного и лабазника вязолистного на определение глицина и кислоты янтарной. С этой целью сравнивали электрофореграммы растворов суммы сухих экстрактов и суммы глицина и кислоты янтарной. Было установлено, что присутствующие в экстрактах гинкго и лабазника биологически активные вещества (БАВ) и вспомогательные вещества таблеток не мешают определению глицина и кислоты янтарной (рис. 2 и 3).

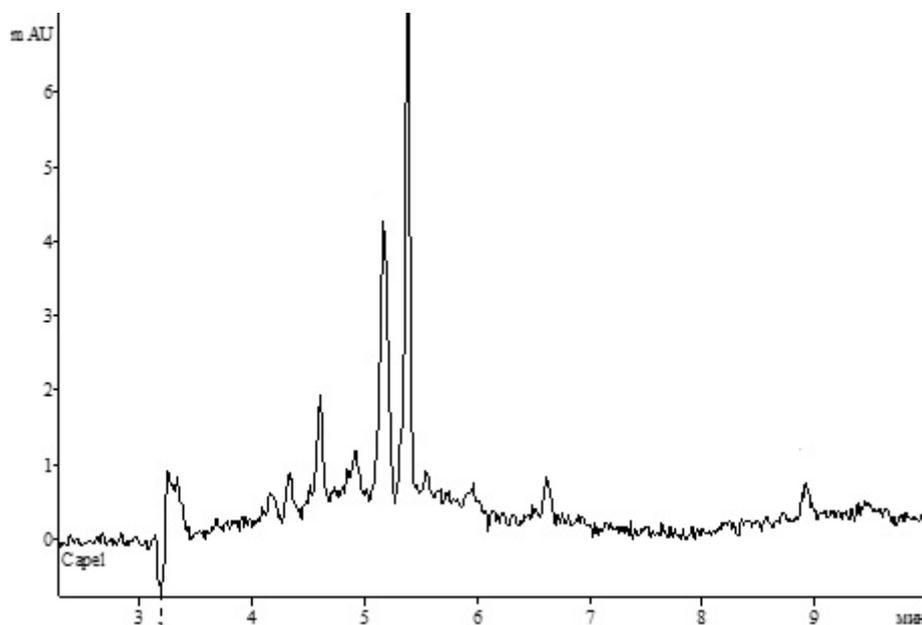


Рис.2. Электрофореграмма модельной смеси без глицина и кислоты янтарной

Кроме того, на электрофореграмме раствора модельной смеси таблеток исследуемые кислоты полностью разделены с другими компонентами пробы (рис.3).

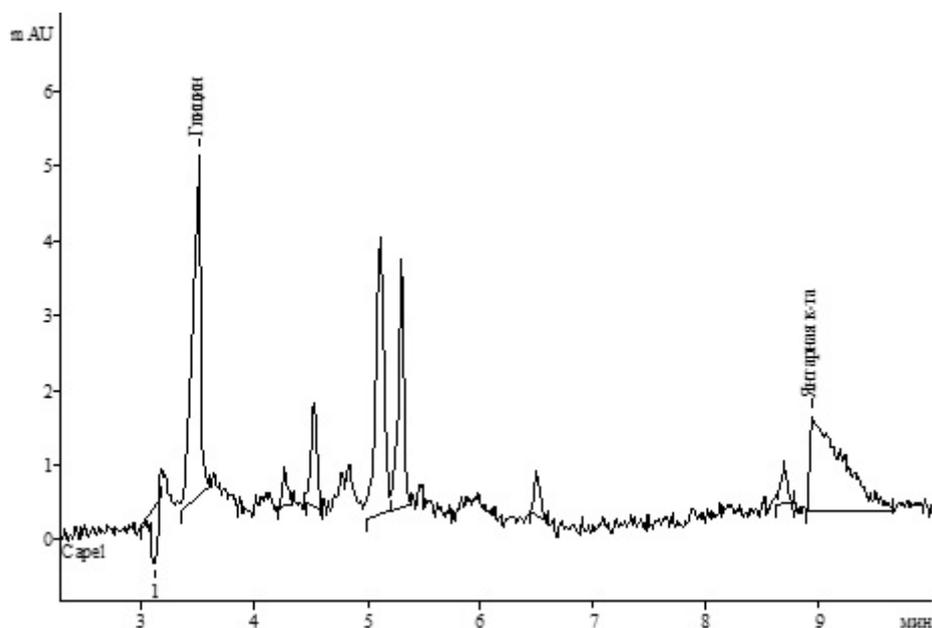


Рис.3. Электрофореграмма модельной смеси таблеток

Проведенные исследования позволили нам предложить методику идентификации глицина и кислоты янтарной путем сравнения времен миграции глицина и кислоты янтарной на электрофореграммах раствора таблеток и соответствующих стандартных образцов. К качественным результатам относится определение идентичности компонента пробы внешнему стандартному веществу по времени появления соответствующего пика [5]. В связи с этим проведена предварительная статистическая обработка по данным времени миграции с помощью программы MSExcel. Полученные данные свидетельствуют о достаточной степени надежности (достоверности) обнаружения глицина и кислоты янтарной (табл.2).

Таблица 2

Статистическая обработка данных времени миграции глицина и кислоты янтарной

Глицин		Кислота янтарная	
Время миграции (t), мин	Метрологические характеристики	Время миграции (t), мин	Метрологические характеристики
3,35	$\bar{t}=3,34$ $SD=0,018$ $RSD=0,52\%$	7,68	$\bar{t}=7,97$ $SD=0,204$ $RSD=2,56\%$
3,32		7,78	
3,35		7,93	
3,33		8,13	
3,37		8,18	
3,34		8,10	

В оптимальных условиях анализа было проведено количественное определение глицина и кислоты янтарной в экспериментальной серии таблеток «Гинкготропил-форте». Результаты количественного определения глицина и кислоты янтарной приведены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты количественного определения глицина и кислоты янтарной в таблетках экспериментальной серии от 27.11.14

Масса таблеток, г	Глицин			Кислота янтарная		
	S _x	X, г/табл	Характеристики	S _x	X, г/табл	Характеристики
0,2131	22,97	0,097	Хср= 0,097 г/табл. SD = 0,001 RSD= 0,77%	25,06	0,019	Хср= 0,020 г/табл. SD = 0,001 RSD= 3,79%
0,2096	22,67	0,097		24,98	0,019	
0,2109	22,38	0,096		26,34	0,020	
0,2137	22,83	0,097		26,28	0,020	
0,2082	22,15	0,098		25,95	0,021	
0,2090	22,19	0,098		26,39	0,020	

Полученные данные свидетельствуют о приемлемой воспроизводимости результатов анализа.

Заключение

Установлены оптимальные условия и разработана методика качественного и количественного определения глицина и кислоты янтарной при совместном присутствии в разрабатываемом препарате «Гинкготропил-форте» с использованием капиллярного электрофореза. Относительное стандартное отклонение результатов количественного определения не превышает 1 % для глицина и 4 % для кислоты янтарной.

Список литературы

1. Комарова, Н. В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» / Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев. – СПб.: ООО «Веда», 2006. – 212 с.
2. Константы ионизации глицина и кислоты янтарной [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.chemicalize.org>
3. Межгосударственный стандарт ГОСТ 4919.2-77. «Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов».
4. Методические рекомендации по ОНМК [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.neurology.ru/professional/Met.rekom.pdf>
5. ОФС 42-0082-08. Капиллярный электрофорез.
6. Технологические аспекты разработки сублингвальных таблеток «Гинкготропил-форте» / А.М. Шевченко [и др.] // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: сб. материалов 5-й Междунар. науч.-практ. телеконф. 17 апреля 2015 г. – Белгород, 2015. – С. 210-216.
7. Федотова В.В., Легина А. О. Количественное определение рутина в желчегонном сборе методом капиллярного электрофореза // Фармация и фармакология. – 2015. – № 3. – С. 75-78.

Рецензенты:

Лазарян Д. С., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск;

Кодониди И. П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.