УДК 543.645.9

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОТОГЕНЕРИРОВАННОГО ЙОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ АМИНОКИСЛОТ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

Турусова Е.В., Григорьева Л.А., Лыщиков А.Н., Насакин О.Е.

ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», Чебоксары, e-mail: elvastur@yandex.ru

Предложена методика ускоренного определения метионина и цистеина в лекарственных средствах, основанная на титровании аминокислот фотогенерируемым йодом. Титрант получали в результате облучения поглотительного раствора, содержащего иодид калия, ацетатный буферный раствор и эозин в течение 1–2 минут. В результате взаимодействия аминокислот с йодом происходит уменьшение его количества, что приводит к уменьшению силы тока в амперометрической цепи. Измерение времени генерации йода до достижения первоначального количества при облучении раствора светом позволяет судить о содержании их в анализируемой пробе. Экспериментально установлено, что вспомогательные компоненты таблеточной массы не мешают определению действующего вещества. Нижний предел определения составляет 0,06 и 0,10 мкг по силе тока, 0,08 и 0,13 мкг по времени генерации йода в поглотительной ячейке для метионина и цистеина соответственно. Применение данного способа определения аминокислот позволяет снизить время единичного определения за счет анализа меньших проб и отсутствия рутинного титрования. Метод не требует применения дорогостоящего оборудования [5].

Ключевые слова: фотогенерированный йод, способ определения, метионин, цистеин

USING OF PHOTO GENERATED IODINE TO ASSESS OF THE AMINO ACID CONTENT IN MEDICAMENTS

Turusova E.V., Grigoreva L.A., Lyschikov A.N., Nasakin O.E.

Federal state educational institution of higher professional education «Chuvash State University named I.N. Ulyanov», Cheboksary, e-mail: elvastur@yandex.ru

Method of accelerated determination of methionine and cystein in medicaments has been proposed. This method is based on amino acid titration with iodine. Titrant was obtained in result of radiation of absorbing solution, which contained potassium iodide, acetate buf er solution and eosin. Irradiation procedure took 1–2 minutes. Decrease of iodine quantity is in resulting from the action of amino acids on iodine. It leads to reduce of amperage in amperometric circuit. Time measurement of iodine generation until the initial amount upon solution irradiation by light allows to reason about amino acid content in analyzed samples. It was experimentally determined, auxiliary components of tablet mass don't interfere to determine active substance. Lower limit of detection is 0,06 and 0,1 mcg in amperage, 0,08 and 0,13 mcg in iodine generation time in absorption cell for methionine and cystein respectively. Using of this method for determining the amino acids allows to reduce time of a single determination due to analysis of smaller samples and non-routine titration. Method does not require expensive equipment

Keywords: photo generated iodine, method for determining, methionine, cystein

Аминокислоты – являются структурной единицей белка, функции которого в живом организме многообразны. В большинстве своем аминокислоты не вырабатываются организмом. Так, например метионин может регенерироваться из гомоцистеина, единственным источником которого в организме служит метионин. В пище гомоцистеина крайне мало, поэтому потребности человека в метионине и гомоцистеине обеспечиваются только метионином пищи или посредством медикаментозной терапии [1]. Согласно [2, 11] метионин и цистеин определяют йодометрическим методом, который предполагает использование неустойчивого титранта – йода. Особого внимания заслуживает способ определения цистеина в водных растворах методом циклической вольтамперометрии [3, 4]. Модификация электродов пленками различной природы позволяет проводить селективное определение тиоаминокислот [7–10], но требует строгого соблюдения условий проведения анализа. Применение фотохимического титрования с биамперометрической индикацией конечной точки титрования позволяет устранить недостатки классической йодометрии. Суть метода заключается в том, что из вспомогательного вещества под действием света получается титрант, который тут же в растворе взаимодействует с аналитом. При этом не требуется предварительной стандартизации титранта, что значительно сокращает время определения.

Цель настоящего исследования – апробация способа определения метионина и цистеина в лекарственных средствах, основанного на титровании тиоаминокислот раствором фотогенерированного йода. В результате взаимодействия метионина или цистеина с йодом происходит уменьшение его количества, что приводит к уменьшению силы тока в амперометрической цепи. Измерение времени генерации йода до достижения первоначального количества при

облучении раствора светом позволяет судить о содержании их в анализируемой пробе.

Экспериментальная часть

Принципиальная схема установки для получения фотогенерированного йода приведена [6].

Методика количественного определения тиоаминокислот в субстанции, таблетках. Навеску порошка массой 0,10 и 0,20 г (точная навеска) субстанции (метионин, цистеин) полученного в результате растирания 10 таблеток препарата (метионин) количественно переносили в мерную колбу емкостью 250 мл, прибавляли 20 мл фосфатного буферного раствора с pH 5,8 и доводили водой до метки. Рабочий раствор препарата готовили разбавлением исходного в 200 раз.

При определении цистеина в комбинированном ЛС («Флуимуцил», АЦЦ-100) навеску порошка массой 3,0 г количественно переносили в мерную колбу емкостью 100 мл и доводили водой до метки. В делительную воронку емкостью 25 мл последовательно вносили 10 мл хлороформа, 4,0 мл пробы и 0,5 мл 0,5 М раствора гидроксида натрия. Пробу экстрагировали в течение 1 минуты. Экстракт переносили в фарфоровую чашку и отгоняли хлороформ на водяной бане. К сухому остатку прибавляли 1,0 мл раствора соляной кислоты (ρ = 1,19 г/мл) и 10 мл воды, смывали остаток на дно чашки, количественно переносили в мерную колбу емкостью 50 мл и доводили водой до метки.

В сосуд для титрования помещали 40 мл 0,5 М раствора йодида калия, 10 мл раствора эозината натрия, 20 мл ацетатного буферного раствора (pH = 5,6). Ячейку продували воздухом и облучали видимым светом в течение 1–2 минут. Йод генерировали со скоростью $3{,}2 \cdot 10^{-5}$ ммоль/мин до содержания его $4 \cdot 10^{-5}$ ммоль. О концентрации титранта судили по изменению тока в цепи. После генерации йода отключали источник света и вводили 0,1–0,5 мл рабочего раствора препарата, фиксируя при этом изменение показаний гальванометра. После достижения постоянства силы тока ячейку вновь продували воздухом в течение 1–2 минут, облучали светом и измеряли время генерации, необходимое для восполнения убыли титранта. Для проведения последующих определений раствор, находящийся в сосуде для титрования, вновь облучали светом, генерируя в нем определенное количество йода. Один и тот же поглотительный раствор позволяет проводить 10–20 определений.

О количестве действующего вещества в аналите судили по градуировочным графикам, полученным с использованием стандартных растворов (рис. 1, 2).

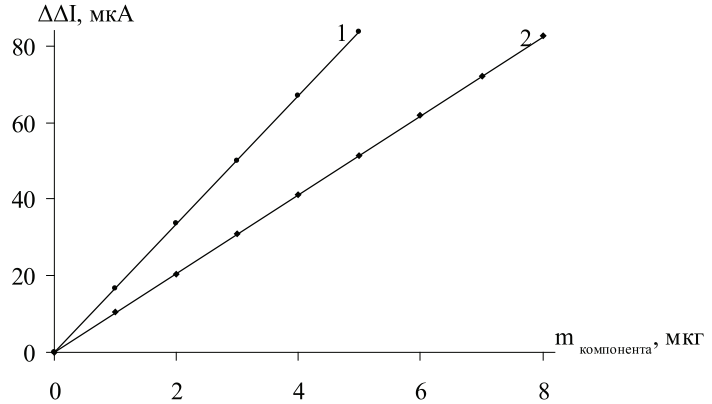

Рис. 1. Калибровочный график для определения метионина (1) и цистеина (2) по изменению силы тока: 1 – $\Delta\Delta I = 16{,}729\ m + 0{,}0714$, $R^2 = 1$; 2 – $\Delta\Delta I = 10{,}3\ m + 0{,}0556$, $R^2 = 1$

По результатам титрования модельных растворов метионина и цистеина найдено, что в кислой среде реакция с йодом протекает в соотношении 1:1 и 2:1 соответственно, что согласуется с литературными данными [1, 11]. Установлено, что вспомогательные компоненты таблеточной массы не мешают определению действующего вещества. Результаты определения препаратов, найденные фотохимическим методом по времени генерации (табл. 1–3), и изменению силы тока (табл. 1–3) согласуются между собой, а также с результатами, полученными по стандартной методике [2, 11]. Достоверность полученных результатов контролировали по стандартной методике и методом добавок.

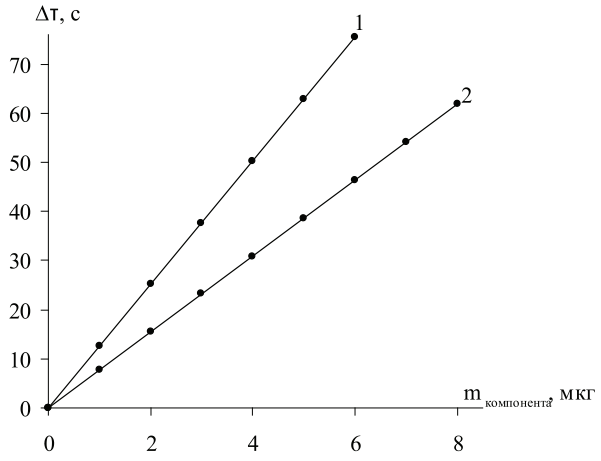

Рис. 2. Калибровочный график для определения метионина (1) и цистеина (2) по времени генерации: 1 – Δτ = 12,594 m – 0,0524, R^2 = 1; 2 – Δτ = 7,7583 m – 0,0889, R^2 = 0,9999

Таблица 1

Метрологические характеристики определения метионина в субстанции

Действующее вещество	Фотохимический метод				Метод [2, 11]	
	по силе тока		по времени генерации			
	Найдено, мг	Метрологические характеристики	Найдено, мг	Метрологические характеристики	Найдено, мг	Метрологические характеристики
Метионин	99,7 99,8 99,7 100,2 100,0 100,3 99,9	$X_{ср}$ = 99,94 $\Delta X_{ср}$ = 0,2 S_x = 0,2371 S_r = 0,002 $\varepsilon_{ср}$ = 0,22 %	99,7 99,8 99,9 100,1 100,0 100,3 99,8	$X_{ср}$ = 99,94 $\Delta X_{ср}$ = 0,1 S_x = 0,1504 S_r = 0,001 $\varepsilon_{ср}$ = 0,14 %	99,6 99,8 99,5 100,3 100,2 100,3 100,0	$X_{ср}$ = 99,96 $\Delta X_{ср}$ = 0,3 S_x = 0,3310 S_r = 0,003 $\varepsilon_{ср}$ = 0,31 %

Примечание. P = 95 %.

Таблица 2

Метрологические характеристики определения цистеина в субстанции

Действующее вещество	Фотохимический метод				Метод [2, 11]	
	по силе тока		по времени генерации			
	Найдено, мг	Метрологические характеристики	Найдено, мг	Метрологические характеристики	Найдено, мг	Метрологические характеристики
Цистеин	99,2 99,0 99,8 99,7 99,9 100,2 100,3	$X_{ср}$ = 99,73 $\Delta X_{ср}$ = 0,5 S_x = 0,4896 S_r = 0,005 $\varepsilon_{ср}$ = 0,45 %	99,3 99,2 99,9 99,8 99,8 100,1 100,2	$X_{ср}$ = 99,76 $\Delta X_{ср}$ = 0,4 S_x = 0,3780 S_r = 0,004 $\varepsilon_{ср}$ = 0,35 %	99,0 99,5 99,0 100,5 100,3 99,8 99,6	$X_{ср}$ = 99,67 $\Delta X_{ср}$ = 0,4 S_x = 0,3869 S_r = 0,004 $\varepsilon_{ср}$ = 0,37 %

Примечание. P = 95 %.

Содержание метионина и цистеина, найденных в анализируемых образцах, соответствуют заявленным в нормативных документах. Нижний предел определения составляет 0,06 и 0,10 мкг по силе тока, 0,08 и 0,13 мкг по времени генерации йода в поглотительной ячейке для метионина и цистеина соответственно.

Фотохимический способ определения метионина и цистеина характеризуется высокой точностью, экспрессностью, не требует дорогостоящего оборудования, что позволяет использовать его в условиях обычной контрольно-аналитической лаборатории.

Выводы

1. Установлены стехиометрические коэффициенты реакции метионина и цистеина с фотогенерированным йодом, составляющие 1:1 и 2:1 соответственно.

2. Установлено, что экстракция ацетилцистеина из щелочных растворов хлороформом позволяет проводить его количественное определение в комплексных лекарственных средствах.

3. Разработана методика количественного определения тиоаминокислот (метионина, цистеина) в различных лекарственных формах, заключающаяся в титровании аналита фотогенерированным йодом (S_r составляет 4,0–5,0 %).

Таблица 3

Результаты определения аминокислот в лекарственных средствах

Наименование ЛС	Найдено в препарате									
	фотохимический								по [2, 11]	
	по силе тока				по времени генерации				$m_{пробы}$ = 0,50 г	
	$m_{пробы}$ = 0,10 г		$m_{пробы}$ = 0,20 г		$m_{пробы}$ = 0,10 г		$m_{пробы}$ = 0,20 г			
	$\overline{m} \pm \Delta \overline{m}$, мг	S_r, %	$\overline{m} \pm \Delta \overline{m}$, мг	S_r, %	$\overline{m} \pm \Delta \overline{m}$, мг	S_r, %	$\overline{m} \pm \Delta \overline{m}$, мг	S_r, %	$\overline{m} \pm \Delta \overline{m}$, мг	S_r, %
Метионин[1]	62,5 ± 2,5	4,0	62,7 ± 2,4	3,8	62,1 ± 1,9	3,1	62,5 ± 2,5	4,0	62,3 ± 2,4	3,5
Метионин[2]	98,0 ± 4,0	4,1	99,1 ± 4,0	4,0	99,2 ± 3,7	3,7	99,6 ± 3,4	3,4	99,2 ± 3,1	3,1
Флуимуцил[3]	199,0 ± 7,5	3,8	200,0 ± 7,2	3,6	199,0 ± 7,4	3,7	200,0 ± 7,3	3,7	199,0 ± 7,2	3,6
АЦЦ-100[4]	99,0 ± 4,0	4,0	100,0 ± 3,9	3,9	100,0 ± 3,9	3,9	100,0 ± 3,8	3,8	99,0 ± 3,4	3,4

Примечание. *(P* = 95 %, *n* = 5). [1] – ООО «Озон», г. Жигулёвск (Россия), серия 020213; [2] – Фармстандарт-Юфавита, г. Уфа (Россия), серия 010313; [3] – Zambon (Италия), ПN 015474/01; [4] – Салютас-Фарма ГмбХ (Германия), 3u1586.

Список литературы

1. Биохимия: учебник для вузов / под ред. Е.С. Северина – 5-е изд., – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 768 с. – ISBN: 978-5-9704-1195-7.

2. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. В 2 ч: учеб. пособие. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Медпресс-информ, 2007. – С. 211. – ISBN 5-98322-206-6.

3. Перевезенцева Д.О., Миронец Е.В., Горчаков Э.В. Способ определения цистеина в водных растворах методом циклической вольтамперометрии на графитовом электроде, модифицированном коллоидными частицами золота // Патент России № 2463587. 2011. Бюл. № 28.

4. Перевезенцева Д.О. Электрокаталитический отклик цистеина на графитовых электродах, модифицированных наночастицами золота / Д.О. Перевезенцева, Э.В. Горчаков // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2; URL: www.science-education.ru/102-6051 (дата обращения: 09.04.2014)).

5. Турусова Е.В., Насакин О.Е., Лыщиков А.Н. Способ определения производных нитрофурана, пиразола, изоникотиновой кислоты, тиоаминокислот в лекарственных формах // Патент России № 2479840. 2013. – Бюл. № 11.

6. Турусова Е.В., Лыщиков А.Н., Насакин О.Е. Анализатор фотохимический // Патент России № 122490. 2012. Бюл. № 33.

7. Шайдарова Л.Г. Вольтамперометрическое определение цистеина на электроде, модифицированном пленкой политетрасульфофталоцианина никеля (II) / Л.Г. Шайдарова [и др.] // Ученые записки Казанского университета. Сер.: Естественные науки. – 2010. – № 4. – С. 228−237. – ISSN: 1815-6169.

8. Шайдарова Л.Г. Электрохимическое поведение и вольтамперометрическое определение цистеина и цистина на уголь-пастовых электродах, модифицированных металлофталоцианинами / Л.Г. Шайдарова [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2011. – Т. 66. – № 7. – С. 745–754. – ISSN: 0044-4502.

9. Шайдарова Л.Г. Вольтамперометрическое определение цистеина на электроде, модифицированном самоорганизующимся монослоем 4-меркаптопирилина с фталоцианином железа (II) / Л.Г. Шайдарова [и др.] // Ученые записки Казанского университета. Сер.: Естественные науки. – 2012. – Т. 154. – № 4. – С. 112–123. – ISSN: 1815-6169.

10. Шайдарова Л.Г. Электрокаталитическое окисление и проточно-инжекционное определение серосодержащих

аминокислот на стеклоуглеродном электроде, модифицированном пленкой политетрасульфофталоцианина никеля (II) / Л.Г. Шайдарова [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2013. – Т. 68. – № 6. – С. 596. – ISSN: 0044-4502.

11. Фармацевтическая химия: учеб. пособие; под ред. А.П. Арзамасцева. – М.: ГЭОТАР-МЕД. 2004. – 640 с. – ISBN: 5-9231-0438-5.

References

1. Biochemistry: textbook for high schools / edited by E.S. Severin fifth edition Moscow: GEOTAR-Media, 2009. pp. 768 ISBN: 978-5-9704-1195-7.

2. Belikov V.G. Pharmaceutical Chemistry. In 2 parts: textbook / V.G. Belikov fourth edition, revised and enlarged Moscow: Medpress-inform, 2007. pp. 211. ISBN: 5-98322-206-6. E.V. Turusova, O.E. Nasakin, A.N. Lyschikov Pat. Russian 2479840 2013. bulletin № 11.

3. Perevezentseva D.O., Mironets E.V., Gorchakov E.V. Method for determining of cysteine in aqueous solutions by cyclic voltammetry on a graphite electrode, modified colloidal gold particles // Russian patent no. 2463587. 2011. bulletin no. 28.

4. Perevezentseva D.O., Gorchakov E.V. Electrocatalytic response of cysteine on graphite electrodes modified gold nanoparticles // Contemporary issues of science and education. 2012. no. 2; URL: www.science-education.ru/102-6051 (the date of treatment: 09.04.2014).

5. Turusova E.V., Nasakin O.E., Lyschikov A.N. method for determining of nitrofuran derivatives, pyrazole, isonicotinic acid, thioamino acids in dosage forms// Russian patent no. 2479840. 2013. bulletin no. 11.

6. Turusova E.V., Nasakin O.E., Lyschikov A.N. Photochemical analyzer // Russian patent no. 122490. 2012. bulletin no. 33.

7. Shaydarova L.G. Voltammetric determination of cysteine on the electrode, modified nickel poly tetra phthalocyanine (II) film / L.G. Shaydarova [et al.] // memoirs of Kazan University. Ser.: Natural sciences. 2010 no. 4. pp. 228-237. ISSN: 1815-6169.

8. Shaydarova L.G. Electrochemical behavior and voltammetric determination of cysteine and cystine on carbon-paste electrodes, modified metallophthalocyanines / L.G. Shaydarova [et al.] // magazine of Analytical Chemistry. 2011. Vol. 66, no. 7. pp. 745-754. ISSN: 0044-4502.

9. Shaydarova L.G. voltammetric determination of cysteine on the electrode, modified self-assembled monolayer of 4-merkaptopirilin with iron phthalocyanine (II) / L.G. Shaydarova [et al.] // memoirs of Kazan University. Ser.: Natural sciences. 2012. Vol. 154, no. 4. pp. 112–123. ISSN: 1815-6169.

10. Shaydarova L.G. Electrocatalytic oxidation and flow-injection determination of sulfur-containing amino acids on glass carbon electrode, modified nickel poly tetra phthalocyanine (II) film / L.G. Shaydarova [et al.] // magazine of Analytical Chemistry. 2013. Vol. 68, no. 6. pp. 596. ISSN: 0044-4502.

11. Pharmaceutical Chemistry: textbook edited by A.P. Arzamastsev. Moscow: GEOTAR-Med. 2004. pp. 640 ISBN: 5-9231-0438-5.

Рецензенты:

Шевердов В.П., д.фарм.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары;

Павлова С.И., д.м.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары.

Работа поступила в редакцию 18.04.2014.