

Реферат

Выпускная квалификационная работа 78 с., 8 рис., 26 табл., 43 источника.

Ключевые слова: глутаминовая кислота, идентификация, количественное определение, фармацевтические препараты, ИК- спектроскопия.

Объектами исследования являются фармацевтические препараты «Глутаминовая кислота» (ОАО «Татхимфармпрепараты») и «Элтацин» (ООО «Медицинский научно-производственный комплекс «БИОТИКИ»).

Цель работы: идентифицировать и количественно определить глутаминовую кислоту в фармацевтических препаратах

В результате исследования идентифицирована глутаминовая кислота в фармпрепаратах химическим методом и методом ИК – спектроскопии. Количественно определено содержание глутаминовой кислоты в лекарственных препаратах методами кислотно-основного и потенциометрического титрования. Подобраны рабочие условия определения глутаминовой кислоты в фармпрепаратах.

Потенциальными потребителями результатов НИР могут быть фармацевтические заводы, лаборатории контроля-качества, разные предприятия пищевой промышленности.

| Номер раздела | Наименование раздела | Стр. |
|---------------|---|------|
| | Введение | |
| 1 | Литературный обзор | |
| 1.1 | Роль глутаминовой кислоты в организме | |
| 1.2 | Строение, свойства, получение глутаминовой кислоты | |
| 1.3 | Методы идентификации глутаминовой кислоты | |
| 1.4 | Методы количественного определения глутаминовой кислоты | |
| 2. | Экспериментальная часть | |
| 2.1 | Химическая посуда, реактивы, оборудование | |
| 2.2 | Описание методик идентификации и количественного определения глутаминовой кислоты | |
| 3 | Обсуждение результатов | |
| 3.1 | Идентификация глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах химическим методом и методом ИК-спектроскопии | |
| 3.2 | Количественное определение глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах методом кислотно-основного титрования | |
| 3.3 | Количественное определение глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах методом потенциометрического титрования | |
| 4. | Социальная ответственность | |
| 4.1 | Производственная безопасность | |
| 4.2 | Экологическая безопасность | |
| 4.3 | Безопасность в чрезвычайных ситуациях | 2 |

| | | |
|-----------|--|--|
| 5. | Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение | |
| 5.1 | Общая характеристика НИР | |
| 5.2 | Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения | |
| 5.3 | Планирование научно-исследовательских работ | |
| 5.4 | Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования | |
| | Выводы | |
| | Список литературы | |

Введение

В настоящее время фармация, как неотъемлемая часть медицины, продолжает интенсивно развиваться. Появляется все больше лекарств и препаратов. Следовательно, задача контроля качества и идентификации лекарственных препаратов получает особое значение, так как с появлением новых фармпрепаратов увеличивается количество фальсифицированных продуктов, не соответствующих нормам Фармакопеи. Необходимо контролировать содержание лекарственных препаратов с целью недопущения выпуска фальсифицированной продукции на рынок.

Целью данной работы являлось – идентифицировать и количественно определить глутаминовую кислоту в лекарственных препаратах. Глутаминовая кислота важна для организма, так как выполняет ряд функций, необходимых для нормальной жизнедеятельности человека: принимает участие в обмене белков и углеводов, активизирует процессы окисления, благоприятствует уничтожению и выведению из организма нитрида водорода (аммиака). Она способствует также образованию ацетилхолина и аденозинтрифосфорной кислоты, переносу ионов калия. [1] Важная особенность глутаминовой кислоты заключается в способности служить иммунным фактором при интоксикации печени и почек. Также глутаминовая кислота усиливает фармакологическое действие, либо ослабляет токсичность лечебных средств и поддерживает наряду с другими аминокислотами постоянную реакцию среды. С помощью введения в организм глутаминовой кислоты возможно осуществлять лечение многих заболеваний. [3]

Для решения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Идентифицировать глутаминовую кислоту в фармацевтических препаратах химическим методом и методом ИК-спектроскопии.

2. Подобрать рабочие условия определения глутаминовой кислоты в фармперепаратах методами кислотно-основного и потенциометрического титрования.

3. Провести сравнительное определение глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах методами кислотно-основного и потенциометрического титрования.

Объектами исследования работы были выбраны фармацевтические препараты «Глутаминовая кислота» (ОАО «Татхимфармпрепараты») и «Элтацин» (ООО «Медицинский научно-производственный комплекс «БИОТИКИ»). Данные лекарственные средства обладают широким спектром фармакологических свойств: повышают работу сердца, улучшает физическую активность, повышает мозговой метаболизм и т. д. [4]

Потенциальными потребителями результатов исследования могут быть фармзаводы, лаборатории контроля-качества, разные предприятия пищевой промышленности.

Литературный обзор

1.1 Роль глутаминовой кислоты в организме

Глутаминовая кислота (2-аминопентандиовая кислота) — это алифатическая дикарбоновая аминокислота. Глутаминовая кислота является частью белков и ряда многих низкомолекулярных веществ.[4] Глутаминовая кислота содержится в свободном виде в живых организмах. Имеет большое значение при обмене азота.

Глутаминовая кислота также является нейромедиаторной аминокислотой, важным представителем класса «возбуждающих аминокислот». Соединение глутамата со специальными рецепторами нервных клеток приводит к возбуждению последних.[5]

В процессе распределения азота глутаминовая кислота играет главную роль. Известно, что глутаминовая кислота (глутамин) составляет около 25% от всего объема всех (заменимых и незаменимых) аминокислот в организме.

Несмотря на то, что глутаминовую кислоту считают классической заменимой аминокислотой, в ходе последних исследований выяснилось, что для некоторых органов человека глутаминовая кислота является незаменимой и не может быть заменена никакой другой аминокислотой.

В организме есть своеобразный "запас" глутаминовой кислоты. Глутаминовая кислота используется сначала там, где она нужнее всего.

Главное назначение глутаминовой кислоты в организме:

1. Интегрирование азотистого обмена.
2. Образование других аминокислот, в т.ч. и гистидина.
3. Обезвреживание аммиака.
4. Синтез углеводов.
5. Участие в образовании нуклеиновых кислот
6. Образование витамина В9 (итероилглутаминовая кислота).
7. Окисление в клетках мозговой ткани с выходом энергии, запасаемой в виде АТФ.
8. Нейромедиаторная функция.
9. Преобразование в γ -аминомасляную кислоту (ГАМК).
10. Участие в процессе синтеза ферментов, которые совершают редокс реакции.
11. Участие в синтезе серотонина (опосредованное, через триптофан).
12. Повышение проницаемости мышечных тканей для ионов калия.
13. Образование н-аминобензойной кислоты.[5]

Все заменители аминокислоты, как уже было сказано, могут быть получены из глутаминовой кислоты. Однако в ходе последних исследований выяснилось, что глутаминовая кислота имеет способность преобразовываться и в некоторые незаменимые аминокислоты, такие как в гистидин и аргинин.

Гистидин принимает активное участие в метаболизме. Он участвует в образовании карнозина и анзерина - безбелковых соединений, содержащих азот в мускулатуре. Карнозин осуществляет противooksидлительные

функции, помогает регулированию клеточных мембран мышечных волокон. Карнозин значительно повышает работоспособность мышц: он противодействует развитию утомления в мышце, однако не способен полностью восстановить работоспособность уже утомленной мышцы. Анзерин является производным карнозина и имеет сходное с ним действие.[6]

Кроме синтеза карнозина и анзерина, гистидин оказывает положительное влияние на организм: улучшение функции печени, повышение желудочной секреции и моторной активности кишечника. Эти функции благотворно сказываются на переваривающей способности желудочно-кишечного тракта. Гистидин – хорошее противоязвенное средство. Он способствует заживлению язв желудочно-кишечного тракта. Гистидин имеет хорошее анаболическое действие спомощью увеличения выброса в кровь соматотропного гормона гипофизом. Гистидин обладает способностью повышать иммунитет, ослаблять воздействие на организм предельных факторов, налаживает сердечный ритм. Используется в медицине при многих заболеваниях, таких как язвенная болезнь, гастрит, гепатит, снижение иммунитета и атеросклероз.

Аргинин является незаменимой аминокислотой. Особенно он важен в молодом организме, когда ограничен его синтез из глутаминовой кислоты. Он оказывает значимое анаболическое действие, стимулирует выброс в кровь соматотропного гормона. Аргинин совместно с глицерином принимает участие в синтезе креатина в мышцах. Таким образом, он повышает мышечную работоспособность. Аргинин также активизирует синтез тестостерона в организме, при этом заметно повышает половую активность у мужчин. При немаленьких концентрациях аргинин применяется при лечении эректильной дисфункции и для увеличения активности половых клеток у мужчин.[7]

При взаимодействии глутаминовой кислоты с аммиаком образуется глутамин. Аммиак является высокотоксичным соединением, образующимся

как вторичное соединение обмена азота. Аммиак составляет 80% всех азотистых токсинов. В процессе присоединения аммиака глутаминовая кислота превращается в нетоксический глутамин, а он уже принимает участие в аминокислотном обмене. В составы спортивного питания и пищевых добавок используются как глутамин, так и глутаминовая кислота. Глутаминовая кислота является наиболее предпочтительной, так как она обладает дезинтоксикационным действием. Если организму потребуется не глутаминовая кислота, а именно глутамин, организм может получить его присоединив к глутаминовой кислоте аммиак, которого в организме в избытке.[8]

Биосинтез углеводов из глутаминовой кислоты, прежде всего из глюкозы, чрезвычайно важен как резервный механизм снабжения мозга глюкозой при отсутствии питания углеводами либо при очень больших физических нагрузках. [9]

Глюкоза является основным поставщиком энергии для головного и спинного мозга. Она усваивается без помощи инсулина. Без глюкозы мозг моментально погибает, следовательно в организме в ходе развития предвидена основательная система эндогенного синтеза глюкозы. При нехватке в крови глюкозы в организме сразу же запускаются процессы образования глюкогексозы из аминокислот, жиров, молочной и пировиноградной кислот, кетокислот, спиртов. Процесс синтеза глюкозы в организме называется глюконеогенезом, что означает "новообразование" глюкозы. Данный процесс наиболее активно проходит в печени, чуть меньше в почках и напоследок в кишечнике. Особенно активно глутаминовая кислота преобразуется в глюкозу в кишечнике. Но она способна не только превращаться в глюкозу сама. Также она ускоряет образование глюкозы (глюконеогенеза) из других веществ в печени и почках. За это глутаминовая кислота получила название глюконеогенной аминокислоты. По своему свойству - стимулировать (прямо или косвенно) глюконеогенез глутаминовая кислота уступает лишь аланину. Самый

первый путь синтеза глюкозы - это использование аминокислот и здесь глутаминовая кислота имеет очень важную роль. Стимуляция глюконеогенеза приводит к выведению в печени молочной кислоты с образованием глюкозы. [11]

Если после тренировки принять большую дозу глутаминовой кислоты, это приведет к значительному уменьшению утомления за счет полного выведения молочной кислоты, нейтрализации аммиака, который энергизирует функции глутаминовой кислоты.[12]

С помощью глутаминовой кислоты происходит биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, принимающих участие в образовании молекул ДНК и РНК. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды проявляют ярко выраженное анаболическое действие, в первую очередь на быстроделющиеся клетки. Поэтому они очень хорошо улучшают кроветворение (так как кроветворные клетки наиболее быстро делятся). Более слабо они проявляют свое анаболическое действие на желудочно-кишечный тракт. Еще слабее их анаболическое воздействие сказывается на скелетной мускулатуре. Даже в случае её полного отсутствия пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды все равно положительно бы влияли на рост мышечной ткани хотя бы за счет повышения работы желудочно-кишечного тракта. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды больше всего содержатся в дрожжах (пекарские и пивные), которые выпускаются в качестве отдельной пищевой добавки. [7]

Фолиевая кислота является птероилглутаминовой кислотой и образуется из глутамина. Витамин В9 не может действовать сам по себе, изолированно. Она начинает проявлять витаминную активность лишь в сочетании с витамином В12 (цианокоболомином). В основном витамин В9 имеет анаболическое действие. Она в большей степени увеличивает обмен белков, запуская работу аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, а также холина. Также фолиевая кислота участвует в размножении клеток, которое без нее является невозможным.Находясь

вместе с витамином В12 в хромосомах, она регулирует их деление. Фолиевая кислота активизирует кроветворение и повышает содержание в крови и эритроцитов, и лейкоцитов. Благодаря такому действию фолиевая кислота вместе с витамином В12 активно используется в медицинской практике для лечения анемий разного рода. Фолиевая кислота способствует синтезу холина в организме, накоплению в организме лецитинов и снижает содержание в организме холестерина, замедляя таким образом развитие атеросклероза.[23]

Следующий витамин, синтезирующийся из глутамин - это парааминобензойная кислота (парааминобензойная кислота АБК). Ранее было принято считать, что парааминобензойная кислота является всего лишь предшественником синтеза фолиевой кислоты. Однако выяснилось, что это не так. Парааминобензойная кислота обладает большим самостоятельным значением для организма. Она играет важную роль в осуществлении нормальной пигментации волос, кожных покровов, радужки глаза и т.д. В данном случае пигментация зависит от особого рода пигмента - меланина. Последние исследования показали, что меланин помимо пигментации выполняет и другие функции: адаптационную и трофическую. Больше всего меланина содержится в головном мозге. Меланин оказывает влияние на силу и подвижность нервных процессов. В работах некоторых авторов отмечается, что из меланина можно синтезировать катехоламин - нейромедиатор возбуждающего типа действия. В итогах этих исследований появление седины трактуется как результат возрастного истощения депо катехоламинов. Все имеющиеся запасы меланина уходят на осуществление их синтеза и для волос его уже не достаточно. Из парааминобензойной кислоты производят новокаин, широко используемый в современной хирургии.[15]

Глутаминовая кислота вместе с глюкозой являются хорошим источником снабжения для головного мозга. Это связано с ее свойством

окисляться в митохондриях через процесс синтеза кетоглутаровой кислоты с выделением энергии, запасаемой в виде АТФ. [13]

Глутаминовая кислота – самостоятельный нейромедиатор в ряде отделов спинного и головного мозга. Существуют большие группы нервных клеток, в которых глутаминовая кислота используется как единственное вещество, передающее нервный импульс между нервными клетками. В основном она служит для передачи процессов возбуждения. Однако из-за того, что глутаминовая кислота используется для образования еще и тормозных нейромедиаторов, ее возбуждающее действие уравнивается успокаивающим и в большинстве случаев она не оказывает возбуждающего действия. [16]

В головном мозге глутаминовая кислота превращается в гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), которая является не единственным, но основным тормозным нейромедиатором. ГАМК обладает выраженным анаболическим воздействием на мышечные ткани, уменьшает потребность клеток организма в кислороде, активизируя бескислородное окисление энергетических субстратов. Сама ГАМК окисляется кислородными бескислородным путем, с выделением большого количества энергии. В случаях попадания организма в состояние чрезмерного нервно-психического перенапряжения, физической перегрузки, высокой или низкой температуры, тяжелой инфекции и т.д. головной мозг нуждается в значительно большем количестве кислорода. В этом случае приводится в действие так называемый аминокислотный шунт. В течение этого процесса большое количество глутаминовой кислоты превращается в гамма-аминомасляную кислоту, которая окисляется в митохондриях нервных клеток. Это обеспечивает клетки необходимым количеством энергии в экстремальной ситуации. Способность организма бороться со стрессом в первую очередь ограничена энергетическими возможностями нервных клеток. В таком случае увеличивается потребность организма в глутаминовой кислоте. Так как глутаминовая кислота обладает ни возбуждающим, ни тормозным

действием, в энергетическом аспекте она проявляет очень сильное антистрессовое действие как на центральную нервную систему, так на весь организм в целом. В данном случае глутаминовая кислота - своеобразный адаптоген.[17]

Глутаминовая кислота играет важную роль в процессе синтеза АМФ-аденозинмонофосфата, преобразующийся далее в ц-АМФ - циклический аденозинмонофосфат. Многие нейромедиаторы (катехоламины) и гормоны (инсулин) оказывают влияние на поверхностные рецепторы наружной клеточной мембраны, не проникая внутрь клетки. Ц-АМФ является внутриклеточным посредником гормонального сигнала, изменяя в клетке обмен веществ. Воздействием на рецепторы запускается синтез ц-АМФ, а ц-АМФ в свою очередь запускает обменные реакции в клетке. При больших физических нагрузках организм приспосабливается вначале с помощью выброса в кровь большего количества гормонов и нейромедиаторов. С развитием тренированности при следующих физических нагрузках организм начинает приспособление и реагирует на нагрузку, увеличивая синтез ц-АМФ, при этом выброс гормонов и медиаторов играет меньшую роль. Такая реакция сокращает расход гормональных и медиаторных резервов организма и хранит их от истощения. Таким образом, с помощью сложного превращения глутаминовая кислота увеличивает способность клеток к гормональным и медиаторным сигналам. Это способствует более точной реакции организма на большие физические нагрузки и более быстрому приспособлению к ним.[22]

Ц-АМФ, являясь внутриклеточным посредником гормонального сигнала, косвенно увеличивает чувствительность клеток и к половым гормонам, в это же время, стимулируя выброс в кровь половых гормонов и увеличение их количества в мускулатуре. Следовательно мышечный анаболизм в большей степени усиливается. До этого глутаминовая кислота в качестве анаболизирующего фактора применялась для лечения наследственных мышечных дистрофий. [24]

Глютаминовая кислота в организме является источником глюанидинмонофосфата (ГМФ), превращающегося в циклический глюанидинмонофосфат (ц-ГМФ). Ц-ГМФ, как и ц-АМФ, может являться внутриклеточным посредником гормональных и медиаторных сигналов, только уже других. Так, например, ц-ГМФ является внутриклеточным посредником действия ацетилхолина на мышечные и другие клетки. Ацетилхолин является нейромедиатором нервных клеток, составляющих двигательные центры, проводят двигательные импульсы и передают их непосредственно на мышцу. Увеличение чувствительности нервных и мышечных тканей к ацетилхолину в значительной степени влияет на мышечную силу и обновительные процессы в самой мышце. Посредником нервного возбуждения в вегетативной нервной системе является ацетилхолин. Очевидно, что увеличение чувствительности нейронов вегетативной нервной системы к ацетилхолину повышает ее активность в большей степени. Одной из главных функций вегетативной нервной системы является увеличение анаболических функций. Это еще один механизм анаболического действия глютаминовой кислоты. Кроме того, глютаминовая кислота способствует образованию в нервных клетках и самого ацетилхолина, но в меньшей мере. [24]

Энергизирующий эффект глютаминовой кислоты с одной стороны вызван тем фактом, что она участвует в образовании НАД (никотинанидадениндинуклеотид). НАД - специфический фермент, принимающий участие в процессах биологического окисления, которые протекают в митохондриях. В системе дыхания (цепи редокс реакций) НАД переносит электроны и ионы водорода. [25]

Глутаминовая кислота имеет способность преобразовываться в незаменимую аминокислоту триптофан. При дефиците у человека никотиновой кислоты (витамин РР) триптофан образуется в никотиновую кислоту и предупреждает развитие авитаминоза. Из триптофана синтезируется серотонин, который является одним из тормозных

нейромедиаторов центральной нервной системы. Серотонин выполняет анаболическую функцию. Он увеличивает образование белка в организме и замедляет его расщепление, делая активным кору надпочечников и выброс в кровь глюкокортикостероидных гормонов во время тяжелой физической деятельности.[24]

Глутаминовая кислота немного увеличивает проницаемость клеток для ионов калия, благоприятствуя сохранению калия внутри. Это очень важно для мускулатуры, т.к. мышечным тканям необходимо большое количество калия. [27]

Натриевая соль глутаминовой кислоты имеет вкус мяса. В некоторых странах она в больших объемах производится в качестве приправы (Япония). Использование глутамата натрия для придания еде мясного вкуса с каждым годом увеличивается. На сегодняшний день его практически во всех странах добавляют в супы быстрого приготовления, кубики для бульонов, соусы и т.д. [1]

1.2 Структура, физико-химические свойства, получение глутаминовой кислоты

Молярная масса глутаминовой кислоты - 147,13 г/моль, представляет собой бесцветные кристаллы. Температура плавления - 160⁰. Плохо растворима в воде 0,9% при 25⁰, а также в этаноле. Не растворима в эфире. Полный перечень физико-химических свойств глутаминовой кислоты представлен в таблице 1. [8]

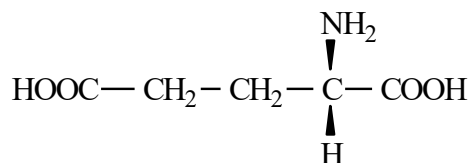


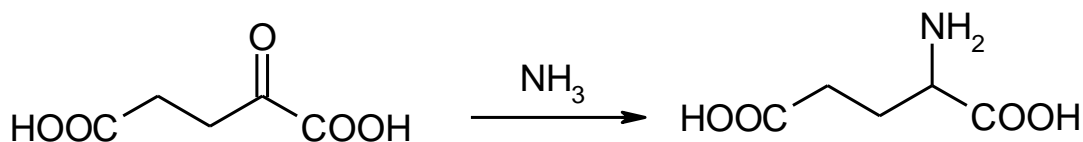
Рисунок 1.1 – Структурная формула глутаминовой кислоты. [2]

По химическим свойствам глутаминовая кислота - типичная алифатическая α-аминокислота. При нагревании образует 2-пирролидон-5-

карбоновую, или пироглутаминовую, кислоту, с Си и Zn-нерастворимые соли. В образовании пептидных связей участвует главным образом α -карбоксильная группа, в некоторых случаях, например у природного трипептидаглютатиона- γ -аминогруппа. В синтезе пептидов из L-изомера наряду с α -NH₂-группой защищают γ -карбоксильную группу, для чего ее этерифицируют бензиловым спиртом или получают третбутиловый эфир действием изобутилена в присутствии кислот. γ -группу COOH остатков глутаминовой кислоты в белках модифицируют так же, как у аспарагиновой кислоты. [8]

Глутаминовая кислота представляет собой α -аминоглутаровую кислоту, она входит в состав веществ: миозина, казеина, β -лактоглобулина и т.д. Больше всего глутаминовая кислота находится в белках мозга, злаках. Глутаминовая кислота синтезируется при сольволизе белковых соединений. Миозин, казеин, α -лактоглобулин содержит до 20% глутаминовой кислоты. Получают аминокислоты из продуктов расщепления белков хроматографическим методом. Эти аминокислоты можно также синтезировать. [9]

На сегодняшний день глутаминовую кислоту промышленным методом получают микробиологическим синтезом из α -кетоглутаровой кислоты (по схеме, аналогичной биосинтезу): [22]



Кроме того, глутаминовую кислоту можно получить из акрилонитрила и ацетиламино말로нового эфира, получаемого следующим образом: [8]

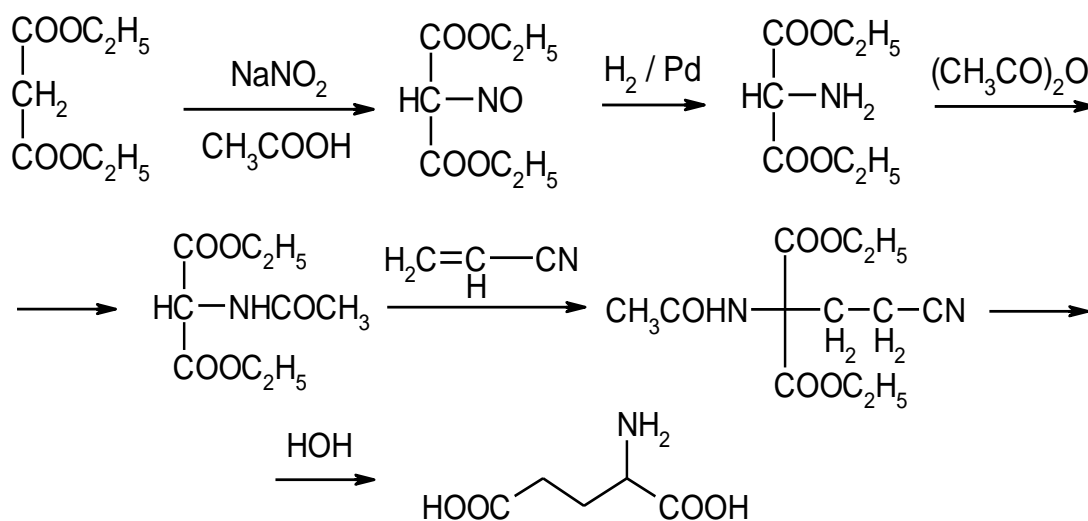


Таблица 1 – Физико-химические свойства глутаминовой кислоты [8]

| <i>Общие свойства</i> | |
|------------------------------|--|
| Систематическое наименование | 2-Аминопентандиовая кислота |
| Сокращения | Глу, Glu, EAA, GAG |
| Традиционные названия | Аминоглутаровая кислота, глутаминовая кислота, глутамат |
| Химическая формула | $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ |
| Рациональная формула | С 40,82 %, Н 6,17 %, N 9,52 %, О 43,5 % |
| <i>Физические свойства</i> | |
| Состояние | Белый кристаллический порошок |
| Молярная масса | $147,1293 \pm 0,006$ г/моль |
| Плотность | 1,46011,538 (25° С) |
| Температура плавления | 160 °С |
| Температура кипения. | 205 °С |
| Температура разложения | свыше 205 °С |
| <i>Химические свойства</i> | |
| pK _a | 4,15; 9,58 |
| Растворимость в воде | 64 г/100 мл |
| Изоэлектрическая точка | 2,2 |

1.3 Методы идентификации глутаминовой кислоты

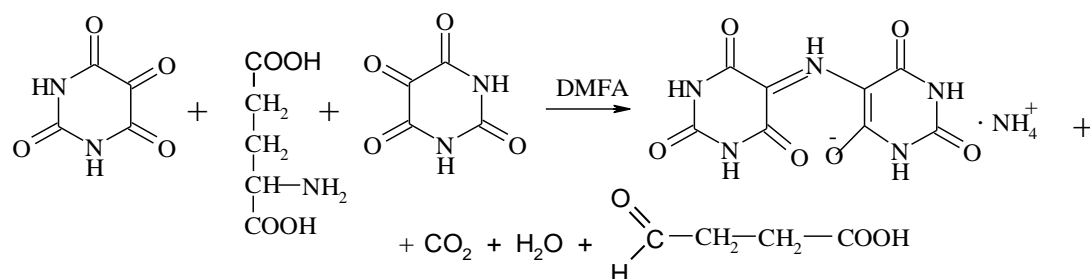
1.3.1 ИК – спектроскопия

Инфракрасная область спектра занимает диапазон длин волн от видимого света до микроволновой области. Метод инфракрасной (ИК) спектроскопии позволяет проверять подлинность субстанций, производить идентификацию и оперативный контроль, как исходного сырья, так и готовых лекарственных форм, поскольку каждое химическое соединение в составе лекарственных средств имеет свой уникальный спектр пропускания, что позволяет однозначно его идентифицировать [14]. Метод ИК-спектроскопии является фармакопейным методом для идентификации глутаминовой кислоты.

Глутаминовую кислоту определяют при помощи ИК-спектров по совпадению полос пропускания в области $4000 - 400 \text{ см}^{-1}$ с прилагаемыми к ФС рисунками спектров[2].

1.3.2 Цветная реакция с аллоксаном:

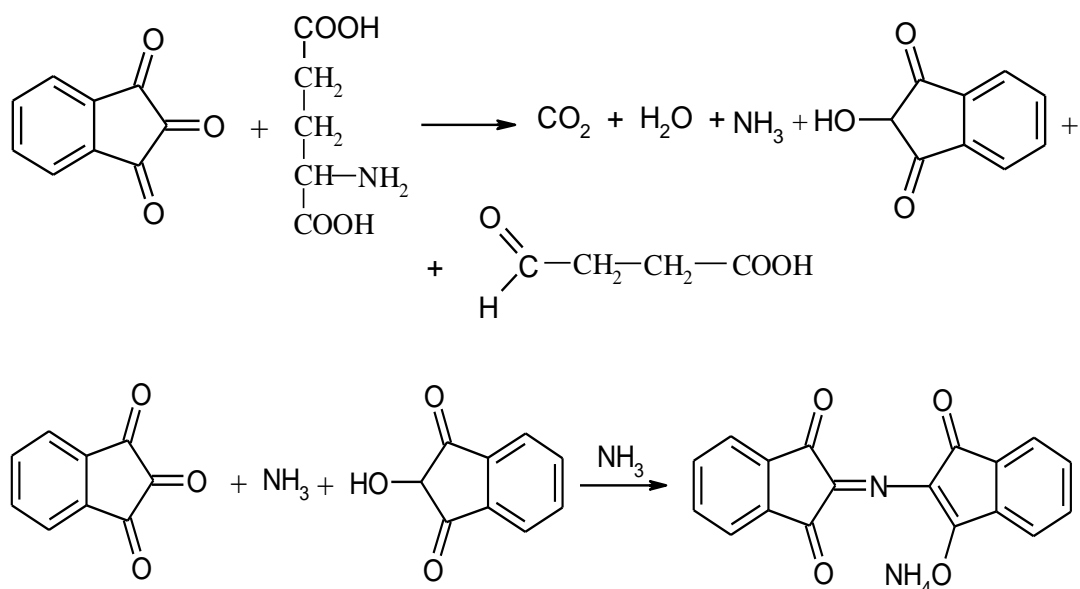
Идентификацию глутаминовой кислоты определяют спектрофотометрическим путем взаимодействия её с аллоксаном в смешанном растворителе вода-диметилформамид по реакции в соответствии литературными данными[7]:



Продуктом реакции является окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 450 нм.

1.3.3 Цветная реакция с нингидрином:

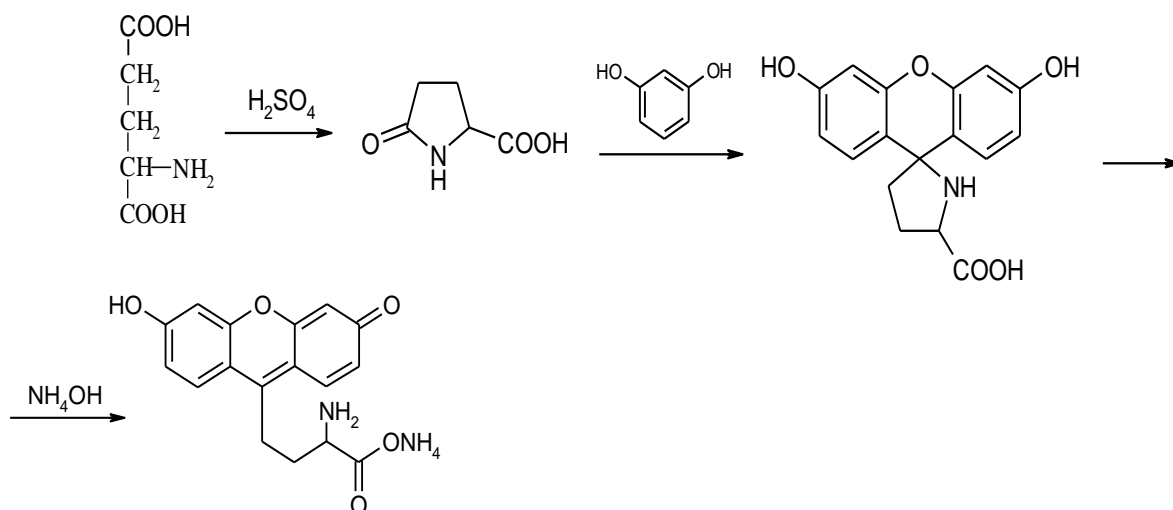
Для идентификации глутаминовой аминокислоты используют общую реакцию на аминокислоты – цветную реакцию с нингидрином, являющейся фармакопейным методом ГФ XII.[2] В результате реакции образуется аммонийная соль енольной формы:



Образующаяся соль дикетогидринденкетогидринамина имеет сине-фиолетовую окраску.[2]

1.3.4 Реакция конденсации с резорцином:

Для идентификации глутаминовой кислоты используют цветную реакцию с резорцином в присутствии H₂SO₄ конц. При действии концентрированной серной кислоты на глутаминовую кислоту происходит внутримолекулярная дегидратация с получением пирролидонкарбоновой кислоты, конденсирующейся с резорцином. В результате получается сплав красного цвета, разлагающийся в аммиачном растворе. После - приобретает фиолетово-красное окрашивание с зелёной флуоресценцией[26].

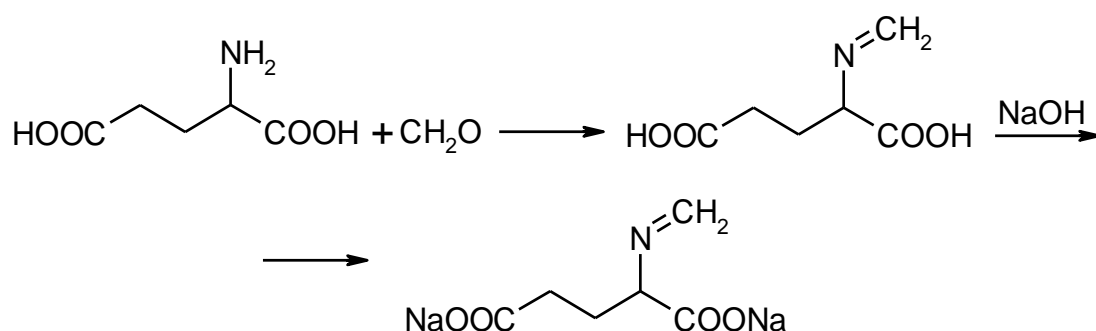


Таким образом, наиболее информативным является инструментальный метод ИК-спектроскопии, который был выбран для идентификации глутаминовой кислоты в лекарственных препаратах. В дальнейшем для сравнения подходящего метода идентификации был выбран химический метод по реакции с нингидридом.

1.4 Методы количественного определения глутаминовой кислоты

1.4.1 Нейтрализация. Формольное титрование (метод Серенсена)

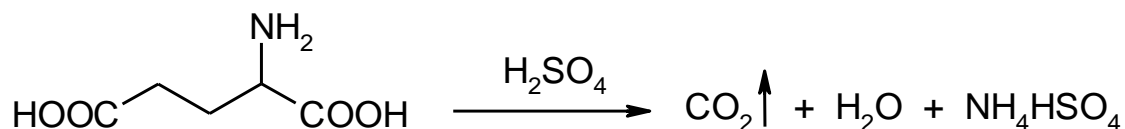
Установление количества глутаминовой кислоты выполняют методом формольного титрования. Сначала добавляют нейтрализованный по фенолфталеину раствор формальдегида. При этом блокируется аминогруппа и образуется N-метиленовое производное (азометин). После этого титруют раствором щелочи как двухосновную кислоту[8]:



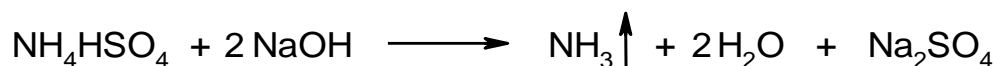
1.4.2 Метод Кьельдаля – определение органически связанного азота

Суть метода заключается в первоначальном разложении глютаминовой кислоты до NH_4HSO_4 . При определении используются колба Кьельдаля, парообразователь, холодильник и приёмник. Процесс включает в себя следующие этапы.

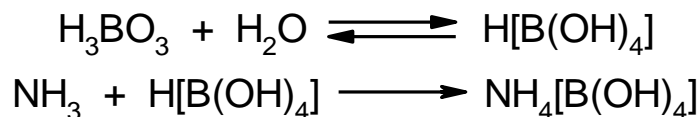
Минерализация – нагревание с H_2SO_4 конц:



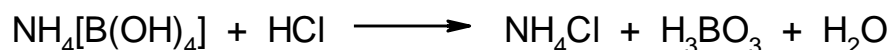
Разложение гидросульфата аммония гидроксидом натрия до аммиака и отгонка его в приёмник:



Взаимодействие аммиака в приёмнике с борной кислотой с образованием тетрагидробората аммония:

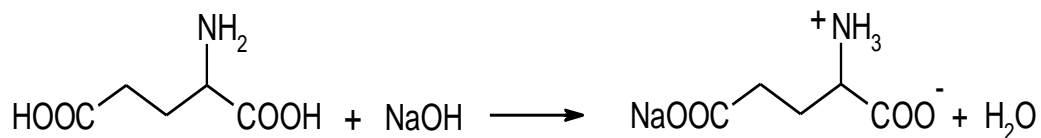


Титрование тетрагидробората аммония 0,1 М раствором соляной кислоты [7]:



1.4.3 Кислотно-основное титрование – алкалиметрия

Также для определения содержания глютаминовой кислоты в лекарственных препаратах используют кислотно-основное титрование. Анализируемый раствор титруют 0,1 М раствором NaOH с индикатором бромтимоловым синим (рН перехода 6.0-6.7). Рабочий раствор нейтрализует только одну карбоксильную группу, т.к. другая образует биполярный ион с α -аминогруппой[8]:



1.4.4 Куприметрическое титрование

Для определения содержания глутаминовой кислоты применяется реакция с ионами меди (II), которая сопровождается появлением хелатных комплексов. Ионы водорода, которые выделяются при этом нейтрализуют фосфатным или боратным буфером, избыток ионов меди удаляют в виде осадка малорастворимой соли или гидроксида. Затем устанавливают количество меди в образовавшемся комплексе с аминокислотой.[26]

1.4.5 Цветные реакции

Цветная реакция аминокислот с аллоксаном используется для фотоколориметрического определения (химизм см. выше). Вначале получают окрашенные растворы стандартных образцов (ГСО) переводя их в аммониевую соль пурпуровой кислоты. Измерив оптическую плотность на фотоколориметрах, строят калибровочный график зависимости интенсивности поглощения окрашенных растворов от концентрации. Затем проводят измерение оптической плотности исследуемого образца и по графику рассчитывают содержание лекарственного вещества в ЛВ или ЛФ.[2]

2. Экспериментальная часть

2.1 Оборудование, реактивы, химическая посуда

Используемые реактивы и стандартные вещества

Вода дистиллированная ГОСТ 6709-72;

Натрия гидроксид NaOH, ГОСТ 4328-77, химически чистый (х.ч.);

Калибровочные буферные растворы с рН 9.18, 6.86, 4.01, 1.65;

Бромтимоловый синий водорастворимый, ТУ 6-09-2045-77, чистый для анализа (ч.д.а);

Феноловый красный, ГОСТ 4599-51, чистый для анализа (ч.д.а.);

L - (+) - глутаминовая кислота

Оборудование, используемое для выполнения НИР

Дистиллятор для подготовки воды очищенной (производитель, ЧЗБТ, Россия). Производительность 7л/ч.

Весы аналитические (класс точности 0,0001 г) (СЕ 124-С, СЕ 224-С, производитель Сартогосм, Россия).

Спектрофотометр универсальный Agilent Cary 60 (Германия).

Электрохимический стенд

Электрохимическая ячейка со стеклянным и хлоридсеребряным электродами

Бюретка для титрования

Плита электрическая

Лабораторная химическая посуда, используемая для выполнения НИР

Колбы мерные 50 см³ ГОСТ 1770-74

Стаканы 25, 50 см³ ГОСТ 1770-74

Пипетки градуированные 1, 5, 10 см³ ГОСТ 1770-74

2.2 Описание методик идентификации и количественного определения глутаминовой кислоты

2.2.1 Идентификация глутаминовой кислоты

Определение глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах проводили химическим методом – качественная реакция с нингидрином и методом ИК спектроскопии.

Для идентификации глутаминовой кислоты химическим методом проводили качественную реакцию с нингидрином. Навеску субстанции,

массой -0,02 г растворили при нагревании в 1 мл свежeproкипяченной воды, прибавили 1 мл свежеприготовленного раствора нингидрина и нагрели. В результате реакции появилось сине-фиолетовое окрашивание.

Для идентификации глутаминовой кислоты методом ИК-спектроскопии анализируемый образец растирают в агатовой ступке до мелкодисперсного состояния ручным способом до состояния «пудры» (при растирании между пальцами не ощущается «жесткости» порошка). Для анализа необходимо взять анализируемый образец, поместить в приставку НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения).[2]

Регистрация спектров

Включение, настройку и прибора проводят строго по инструкции к прибору. Регистрация спектров на ИК-спектрометре с однолучевой схемой

Предварительно снимают фоновый спектр, затем регистрируют ИК-спектр анализируемых образцов: стандарта глутаминовой кислоты и фармацевтического препарата «Элтацин».

Обрабатывают полученные спектрограммы, рассчитывая точное положение максимумов поглощения. Расшифровку спектров проводят, используя литературу [20-21]

2.2.2 Количественное определение глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах

Содержание глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах проводили методами кислотно-основного и потенциометрического титрования.

Метод кислотно-основного титрования (метод нейтрализации)

Анализируемый раствор титруют раствором щелочи NaOH в присутствии индикатора бромтимолового синего. Точную навеску препарата помещают в коническую колбу емкостью 50 см³, добавляют свежeproкипяченной воды, греют на водяной бане в течение 25 мин. до

растворения навески препарата, доводят объем раствора до метки колбы дистиллированной водой. Раствор охлаждают до комнатной температуры. Отбирают аликвоту градуированной пипеткой, объемом 5 см³, добавляют 15 мл дистиллированной воды, 5 капель раствора индикатора бромтимолового синего. Титруют 0,1 н. раствором NaOH до перехода желтой окраски в голубовато-зеленую [2].

Содержание глутаминовой кислоты в препарате (m) вычисляют по формуле:

$$m = \frac{(C_n \cdot V_{т.э.})_{NaOH} \cdot M_{э(г.к.)}}{1000} \cdot \frac{V_k}{V_a}, \text{ г} \quad (1)$$

где C_n - нормальная концентрация, моль-экв/л

$V_{т.э.}$ - объем титранта в точке эквивалентности, мл

$M_{э(г.к.)}$ - молярная масса эквивалента глутаминовой кислоты, г/моль-экв

V_k - объем колбы, мл

V_a - объем аликвоты, мл

Далее по экспериментальным данным строят кривую кислотно-основного титрования – график зависимости рН от степени оттитрованности (f). Для этого используют следующую методику [3].

1. Значение рН до начала титрования рассчитывают по формуле:

$$pH = \frac{1}{2} pK_1(k - ты) - \frac{1}{2} \lg C(k - ты) \quad (2)$$

2. Следующие точки титрования при данном значении f рассчитывают по формуле для буферных смесей с учетом первой константы диссоциации и содержания в растворе кислой соли ($C_{1(соли)}$):

$$pH = \frac{1}{2} pK_1(k - ты) - \lg \frac{C(k - ты)}{C_{1(соли)}} \quad (3)$$

3. Значение рН в первой точке эквивалентности рассчитывают по формуле:

$$pH_1 = \frac{pK_1 + pK_2}{2} \quad (4)$$

4.

Д

алее, как будет достигнута точка эквивалентности, расчет промежуточных точек титрования также рассчитывают по формуле для буферных смесей, но с использованием константы диссоциации по второй ступени:

$$pH = \frac{1}{2} pK_2 (к - ты) - \lg \frac{C(к - ты)}{C(ср. соли)}$$

Приготовление необходимых растворов

Раствор гидроксида натрия 0.1 н: 2 г NaOH помещают в мерную колбу, объемом 500 см³, добавляют немного дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения щелочи и доводят объем раствора до метки колбы дистиллированной водой.

Водный раствор индикатора бромтимолового синего: точную навеску 0.02 г бромтимолового синего помещают в мерную колбу объемом 50 см³, добавляют 0.32 мл 0.1 н раствора NaOH, доводят объем раствора до метки колбы свежепрокипяченной охлажденной водой.

Метод потенциометрического титрования

Включение, настройку прибора проводят строго по инструкции к прибору.

Перед проведением анализа проводят калибровку электродов с помощью буферных растворов.

Объем аликвоты анализируемого раствора помещают в стакан, разбавляют небольшим количеством воды так, чтобы электроды были погружены в раствор на 1.5-2 см. При постоянном перемешивании раствора (магнитной мешалкой) измеряют начальную величину рН. Далее измеряют рН после прибавления очередной порции раствора щелочи. Так проводят

ориентировочное титрование, прибавляя раствор титранта порциями по 0.5 мл.

По резкому изменению рН обнаруживают скачок, отвечающий области точки эквивалентности. Затем выполняют точное титрование с новой аликвотной частью исследуемого раствора в тех же условиях, прибавляя в области скачка рН титрант порциями по 0.1 мл. Титрование заканчивают, когда рН практически перестанет изменяться (3-4 точки).

По экспериментальным данным строят кривую титрования – график зависимости рН от объема титранта. Расчет объема в точке эквивалентности рассчитывают по методу Грана [24].

Содержание глутаминовой кислоты (г.к.) в исследуемом растворе рассчитывают по формуле 1.

3. Обсуждение результатов

3.1 Идентификация глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах химическим методом и методом ИК-спектроскопии

В результате идентификации глутаминовой кислоты в фармпрепаратах по цветной реакции с нингидрином было замечено сине-фиолетовое окрашивание раствора, что является подтверждением ее подлинности. Химическая реакция представлена в п.1.3.3

В результате идентификации глутаминовой кислоты методом ИК-спектроскопии были получены ИК-спектры стандарта глутаминовой кислоты и лекарственных препаратов «Глутаминовая кислота» и «Элтацин» (рис. 2, 3). На рисунке 2 представлен ИК-спектр стандарта глутаминовой кислоты и фармпрепарата «Глутаминовая кислота». Необходимо отметить, что ИК-спектры стандарта и фармпрепаратов оказались идентичны. В них присутствовали интенсивные полосы поглощения при $1000 - 1100 \text{ см}^{-1}$, характерные для валентных колебаний аминогрупп (NH_2) аминокислот. Также было замечено совпадение полос поглощения при 1700 см^{-1} , характерные для валентных колебаний карбоксильных групп (COOH)

аминокислот, что говорит о содержании глутаминовой кислоты в лекарственных препаратах. Характеристика полос представлена в таблице 2.

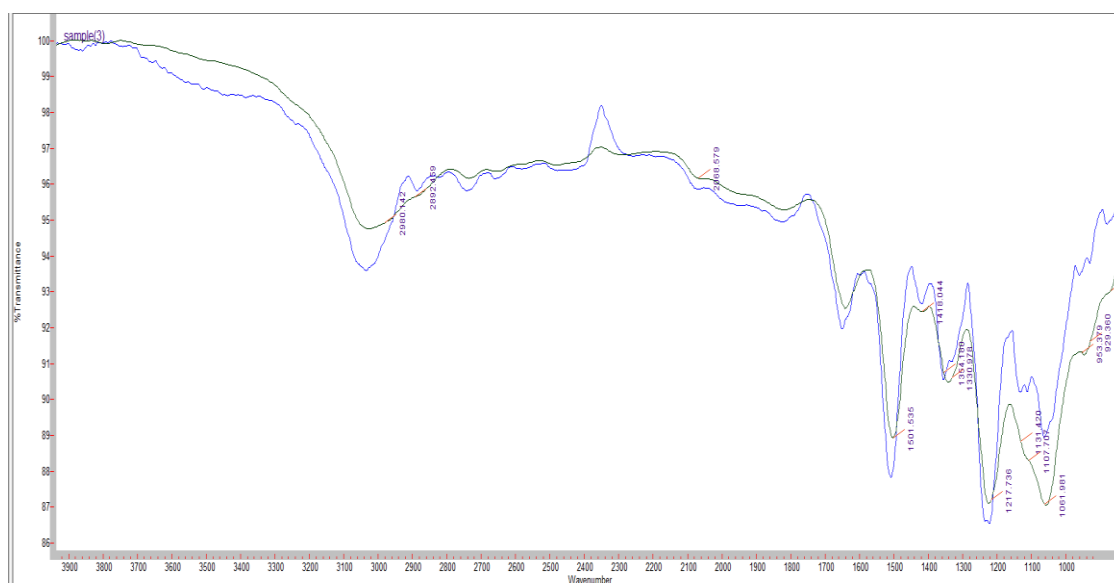


Рисунок 2 – ИК-спектр стандарта глутаминовой кислоты и лекарственного препарата «Глутаминовая кислота»

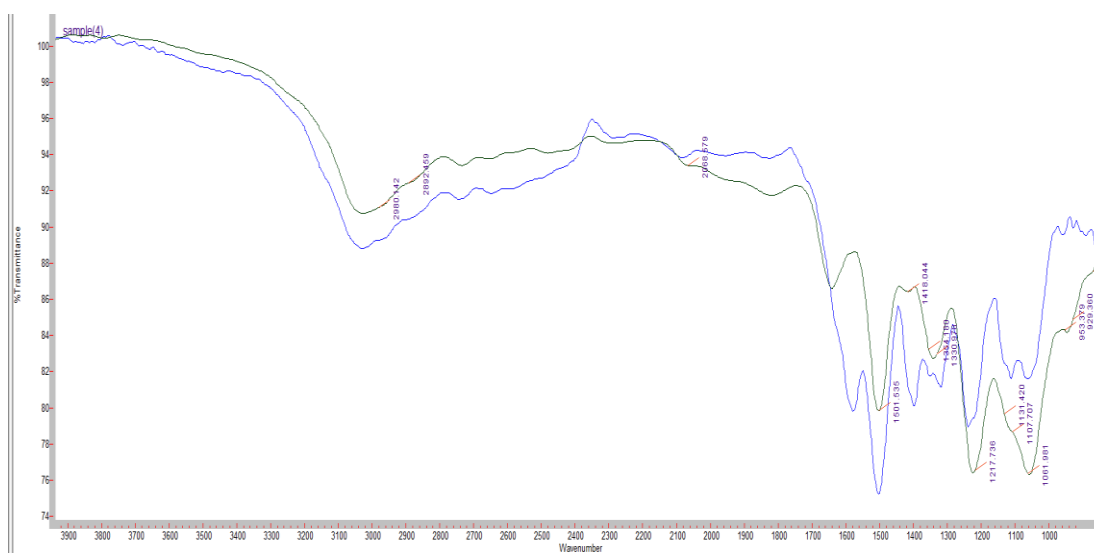


Рисунок 3 - ИК-спектр стандарта глутаминовой кислоты и лекарственного препарата «Элтацин»

Таблица 2 – Характеристика ИК-спектров полос поглощения стандарта глутаминовой кислоты и фармпрепаратов «Глутаминовая кислота» и «Элтацин»

| Структурные фрагменты | Волновые числа, см ⁻¹ | Типы колебаний |
|--------------------------------|----------------------------------|--|
| C-H связь | 3000-3200 | ν, δ (C-H связь) (ср.) валентные и деформационные колебания, полоса средней интенсивности |
| CH ₂ | 2892 | ν (C-H) (с.) валентные колебания, полоса сильной интенсивности |
| R-NH ₂ ⁺ | 2068 | ν (N-H) (ср.) валентные колебания, полоса средней интенсивности |
| =N-H | 1501 | δ (N-H) (ср.) деформационные колебания, полоса средней интенсивности |
| =N-H | 1418 | δ (N-H) (ср.) деформационные колебания, полоса средней интенсивности |
| NH ₄ ⁺ | 1330 | δ (N-H) (с.) деформационные колебания, полоса сильной интенсивности |
| NH | 1217 | ν (C-N) (ср.) валентные колебания, полоса средней интенсивности |
| -NH ₂ | 1107 | ν (C-N) (ср.) валентные колебания, полоса средней интенсивности |
| -NH ₂ | 1061 | ν (C-N) (ср.) валентные колебания, полоса средней интенсивности |
| Кислоты (димеры) | 929 | δ (O-H) (ср.) деформационные колебания, полоса средней |

| | | |
|------|------|---|
| | | интенсивности |
| C=O | 1240 | δ (C=O) (ср.) деформационные колебания, полоса средней интенсивности |
| COOH | 1700 | ν (C=O) (с.) валентные колебания, полоса сильной интенсивности |
| | | |

3.2 Количественное определение глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах методом кислотно-основного титрования.

Определение содержания глутаминовой кислоты в фармпрепаратах проводили, используя метод кислотно-основного титрования. Методика описана в п. 2.2.

Метод основан на нейтрализации растворов фармпрепаратов, содержащих глутаминовую кислоту щелочью. Точкой эквивалентности служит изменение окраски раствора с желтого в сине-зеленый цвет.

В работе данным методом были оттитрованы растворы стандарта глутаминовой кислоты, фармпрепаратов «Глутаминовая кислота» и «Элтацин», а также раствор модельной смеси, который содержал стандарты глутаминовой кислоты, глицина и цистина. Массу глутаминовой кислоты рассчитывали по формуле (1). Результаты титрования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Данные кислотно-основного титрования стандарта глутаминовой кислоты, модельной смеси, лекарственных препаратов

| Объект | Введено, г | Найдено, г | Погрешность, % |
|---------------------|----------------|---------------|----------------|
| Стандартный раствор | 0.7345 ±0.0367 | 0.6170±0.0309 | 16 |

| | | | |
|---|----------------|---------------|----|
| глутаминовой кислоты | | | |
| Модельный раствор смеси (глутаминовая кислота, глицин, цистин, крахмал, метилцеллюлоза) | 0.1404 ±0.0070 | 0.0912±0.0046 | 35 |
| Таблетки «Глутаминовая кислота» | 0.2046 ±0.0102 | 0.1115±0.0056 | 46 |
| Таблетки «Элтацин» | 0.1401±0.0070 | 0.0813±0.0041 | 42 |

В результате титрования была обнаружена погрешность для стандартного раствора глутаминовой кислоты – 16%, для модельной смеси – 35%, для препаратов «Глутаминовая кислота» и «Элтацин» - 46% и 42%. В связи с этим встала необходимость о подборе таких условий титрования, чтобы свести эту погрешность к минимуму. После ряда экспериментов было замечено, что глутаминовая кислота лучше высвобождается из препарата при нагреве водяной бани до температуры 60 °С при времени нагрева - 25 минут. Также необходимо перед каждым титрованием готовить свежий раствор щелочи. Результаты кислотно-основного титрования после подбора рабочих условий представлены в таблице 4.

Таблица 4 –Данные кислотно-основного титрования стандарта глутаминовой кислоты, лекарственных препаратов, модельной смеси после подбора рабочих условий

| Объект | Введено, г | Найдено, г | Погрешность, % |
|--|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Стандартный раствор глутаминовой кислоты | 0.7345±0.0367 | 0.6757±0.0338 | 8 |

| | | | |
|--|---------------|---------------|----|
| Модельный раствор смеси (глутаминовая кислота, глицин, цистин, крахмал, метилцеллюлоза) | 0.0700±0.0035 | 0.0627±0.0031 | 10 |
| Таблетки «Глутаминовая кислота» | 0.0700±0.0035 | 0.0539±0.0027 | 23 |
| Таблетки «Элтацин» | 0.0700±0.0035 | 0.0525±0.0026 | 25 |

Также в работе было оценено мешающее влияние компонентов в лекарственных препаратах. Для этого была приготовлена модельная смесь, содержащая стандарты глутаминовой кислоты, глицина, цистина, а также вспомогательных веществ – крахмала и метилцеллюзы. Исходя из таблицы 4 можно убедиться в том, что содержание в лекарственном препарате других компонентов не мешает количественному определению глутаминовой кислоты данным методом.

Следующим этапом было построение кривой кислотно-основного титрования – графика зависимости рН от степени оттитрованности раствора (f). Для этого использовали методику, представленную в п. 2.2. Результаты расчета представлены в таблице 5. На рисунке 5 представлена экспериментальная кривая титрования стандарта глутаминовой кислоты.

Таблица 5 – Расчет кривой кислотно-основного титрования для стандарта глутаминовой кислоты

| Степень оттитрованности (f) | $\frac{C \text{ кисл.}}{C \text{ соли}}$ | Концентрация ионов H^+ | pH |
|-----------------------------|--|--------------------------|------|
| 0 | - | $[H^+] = \sqrt{KC}$ | 2,67 |
| 0,5 | $\frac{0,5}{0,5} = 1$ | $pH = 4,33 - \lg 1$ | 4,33 |
| 0,75 | $\frac{0,25}{0,75} = 0,33$ | $pH = 4,33 - \lg 0,33$ | 4,81 |
| 0,90 | $\frac{0,10}{0,90} = 0,111$ | $pH = 4,33 - \lg 0,111$ | 5,28 |

| | | | |
|------|------------------------------|--|-------|
| 0,99 | $\frac{0,01}{0,99} = 0,0101$ | $\text{pH} = 4,33 - \lg 0,0101$ | 6,32 |
| 1,0 | - | $\text{pH} = \frac{1}{2}(4,33 + 9,92)$ | 7,13 |
| 1,01 | $\frac{0,99}{0,01} = 9,9$ | $\text{pH} = 9,92 - \lg 9,9$ | 7,93 |
| 1,1 | $\frac{0,9}{0,1} = 9,0$ | $\text{pH} = 9,92 - \lg 9,0$ | 8,96 |
| 1,5 | $\frac{0,5}{0,5} = 1$ | $\text{pH} = 9,92 - \lg 1$ | 9,92 |
| 1,75 | $\frac{0,25}{0,75} = 0,33$ | $\text{pH} = 9,92 - \lg 0,33$ | 10,40 |
| 1,90 | $\frac{0,1}{0,9} = 0,111$ | $\text{pH} = 9,92 - \lg 0,111$ | 10,87 |
| 2,0 | - | $\text{pH} = 7,0 + \frac{1}{2} \cdot 9,92 + \frac{1}{2} \lg 0,1$ | 11,46 |

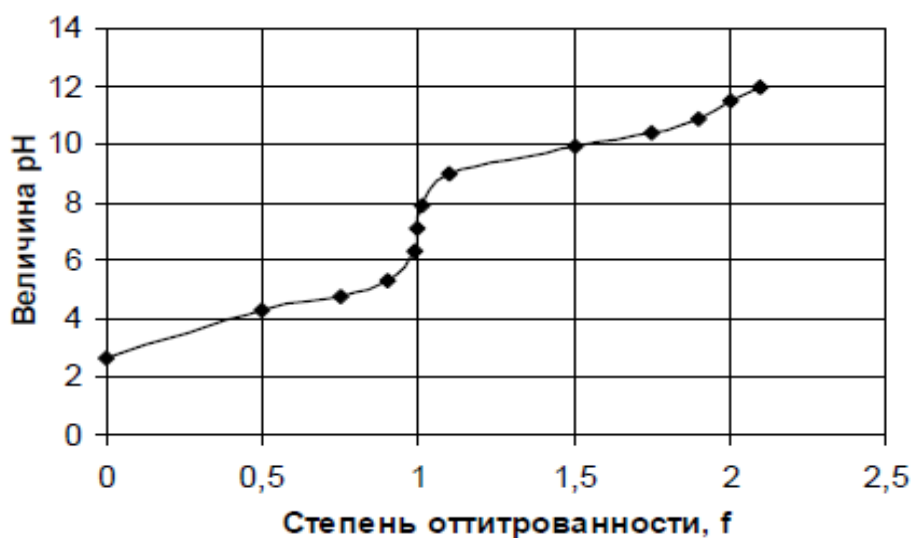


Рисунок 5 – Кривая кислотно-основного титрования глутаминовой кислоты

3.2 Количественное определение глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах методом потенциометрического титрования.

Следующим, сравнительным методом для определения содержания глутаминовой кислоты в фармпрепаратах был метод потенциометрического титрования. Данный метод отличается высокой точностью,

чувствительностью, возможностью проводить титрование в более разбавленных растворах, чем это позволяют визуальные методы анализа.

Определение глутаминовой кислоты в растворах стандарта глутаминовой кислоты, препаратов «Глутаминовая кислота» и «Элтацин», а также в растворе модельной смеси, который содержал стандарты глутаминовой кислоты, глицина и цистина проводили, используя методику, описанную в п. 2.2. По результатам титрования были получены кривые потенциметрического титрования для каждого раствора. Представлены на рисунках 6,7,8.

Далее по методу Грана был рассчитан объем титранта, пошедшего на титрование в точке эквивалентности для каждой кривой. После этого была определена масса глутаминовой кислоты с помощью формулы 1 в разделе 2.2.2 в каждом исследуемом растворе. Результаты расчетов представлены в таблице 6.

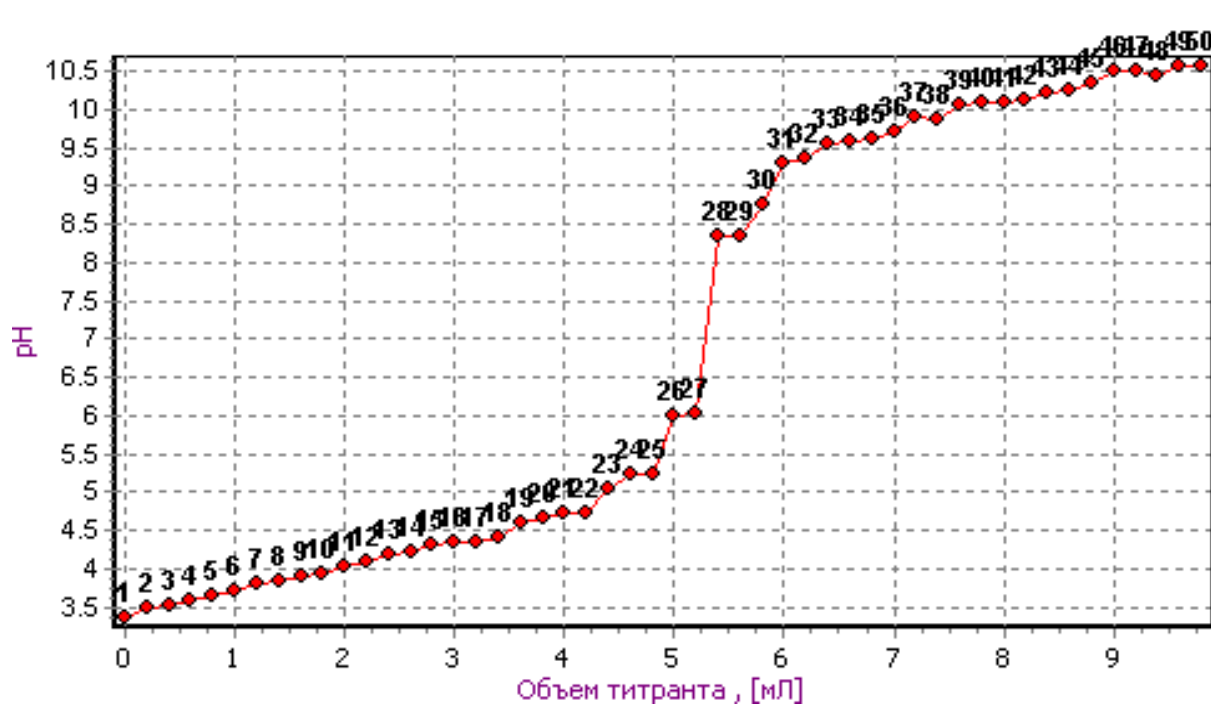


Рисунок 6. – Кривая потенциметрического титрования стандарта глутаминовой кислоты 0.1 н раствором NaOH.

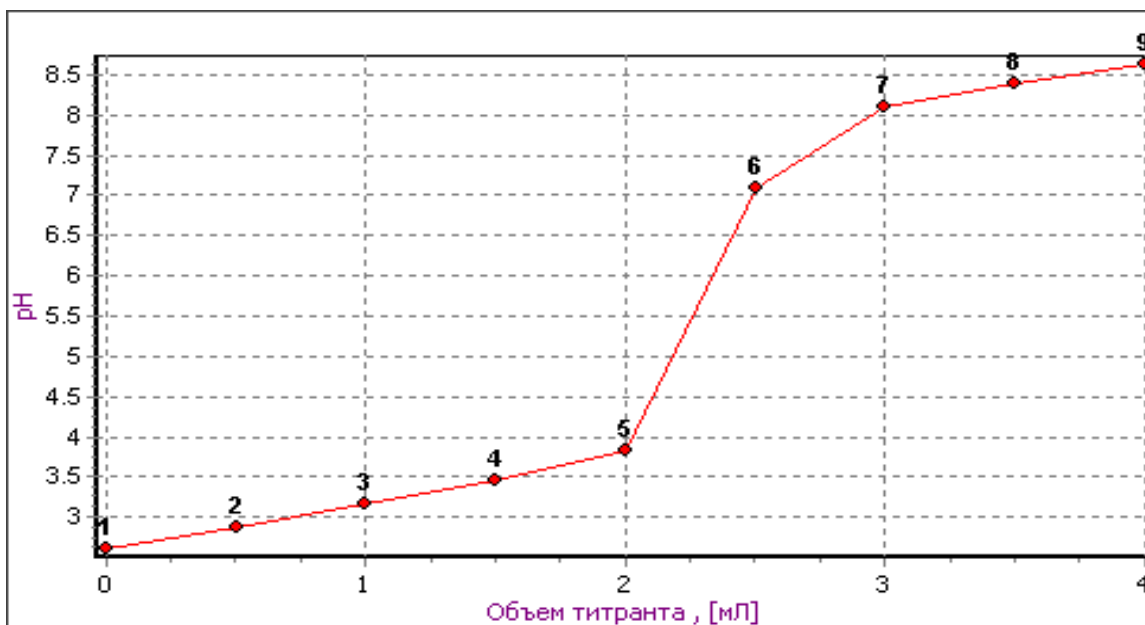


Рисунок 7 – Кривая потенциметрического титрования модельной смеси (глутаминовая кислота+глицин+цистин+крахмалл+метилцеллюлоза) 0.1 н раствором NaOH.

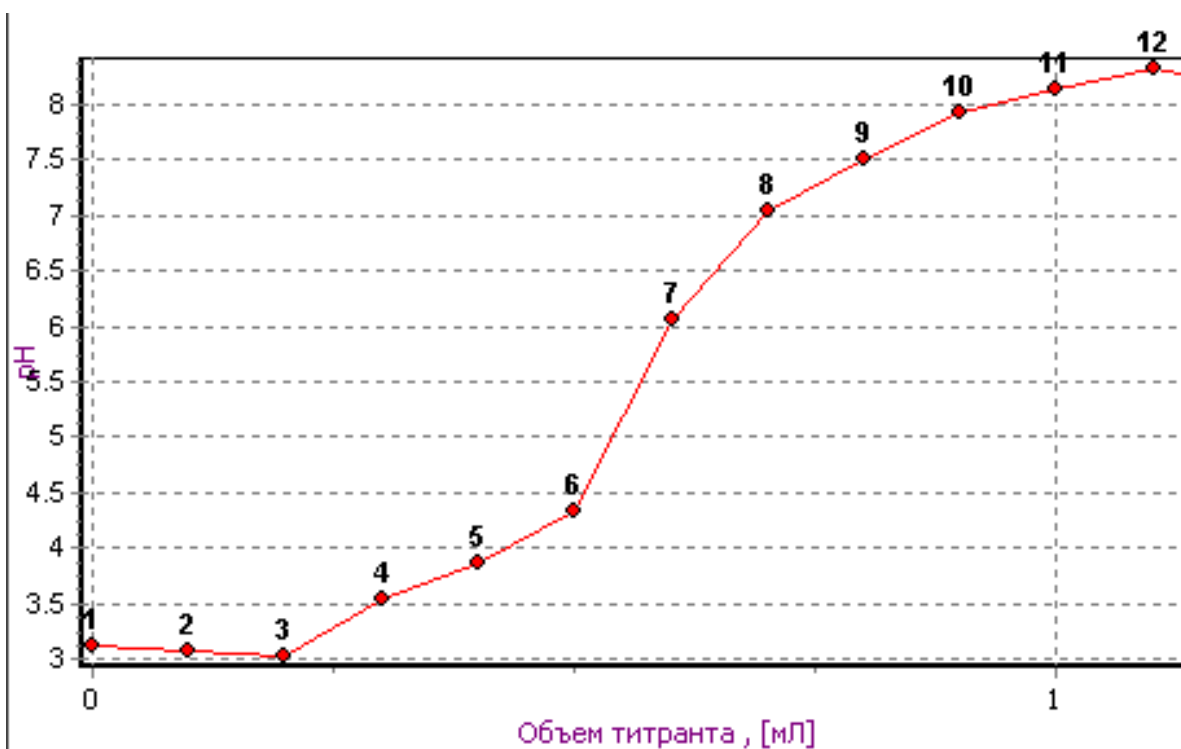


Рисунок 8 - Кривая потенциметрического титрования фармпрепарата «Элтацин» 0.1 н раствором NaOH

Таблица 6 – Данные потенциметрического титрования стандарта глутаминовой кислоты, модельной смеси и фармпрепаратов

| Объект | Введено, г | Найдено, г | Погрешность, % |
|---|---------------|---------------|----------------|
| Стандартный раствор глутаминовой кислоты | 0.7345±0.0367 | 0.6831±0.0342 | 7 |
| Модельный раствор смеси (глутаминовая кислота, глицин, цистин, крахмал, метилцеллюлоза) | 0.0700±0.0035 | 0.0631±0.0032 | 10 |
| Таблетки Глутаминовая кислота | 0.0712±0.0036 | 0.0605±0.0030 | 15 |
| Таблетки Элтаксин | 0.0700±0.0035 | 0.0581±0.0029 | 17 |

Таблица 7 – Данные сравнительного определения глутаминовой кислоты в модельной смеси и фармацевтических препаратах методами кислотно-основного и потенциометрического титрования.

| Объект | Введено, г | Найдено, г | |
|---|---------------|------------------------------|--------------------------------|
| | | Кислотно-основное титрование | Потенциометрическое титрование |
| Стандартный раствор глутаминовой кислоты | 0.7345±0.0367 | 0.6757±0.0338 | 0.6831±0.0342 |
| Модельный раствор смеси (глутаминовая кислота, глицин, цистин, крахмал, метилцеллюлоза) | 0.0700±0.0035 | 0.0627±0.0031 | 0.0631±0.0032 |

| | | | |
|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Таблетки Глутаминовая кислота | 0.0712±0.0036 | 0.0539±0.0027 | 0.0605±0.0030 |
| Таблетки Элтацин | 0.0700±0.0035 | 0.0525±0.0026 | 0.0581±0.0029 |

4. Выводы

По итогам проделанной работы были получены следующие результаты:

1. Идентифицирована глутаминовая кислота химическим методом (качественная реакция с нингидрином) и методом ИК-спектроскопии в фармпрепаратах.

В результате идентификации глутаминовой кислоты в лекарственных препаратах химическим методом по качественной реакции с нингидрином было замечено сине-фиолетовое окрашивание, что является подтверждением ее подлинности.

По итогам идентификации глутаминовой кислоты в фармпрепаратах были записаны спектры поглощения стандарта глутаминовой кислоты и лекарственных препаратов «Глутаминовая кислота» и «Элтацин». Было замечено совпадение полос поглощения лекарственных препаратов со стандартом, что также является подтверждением подлинности лекарственных препаратов на основе глутаминовой кислоты.

2. Были подобраны рабочие условия для определения глутаминовой кислоты в фармпрепаратах методами кислотно-основного и потенциометрического титрования. Время высвобождения глутаминовой кислоты из фармпрепарата составляет 25 минут. Температура нагревания - 60°C.

3. Количественно определена глутаминовая кислота в лекарственных препаратах методами кислотно-основного и

потенциометрического титрования. Было установлено, что метод потенциометрического титрования является более точным и чувствительным.

