



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **98814** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
G01R 31/00
A61K 41/00
A61K 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 12114	(72) Винахідник(и): Блажеєвський Микола Євстахійович (UA), Коретнік Оксана Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 10.11.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.05.2015	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.05.2015, Бюл.№ 9	

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІОТИНУ

(57) Реферат:

Спосіб кількісного визначення біотину включає підготовку проби досліджуваного зразка шляхом додавання надлишку окисника в присутності кислоти, з подальшим відновленням на ртутному мікроелектроді розчину утвореного похідного біотину. Як окисник використовують калій гідрогенпероксомоносульфат в присутності 0,25 моль/л розчину фосфатної кислоти, а полярографування утвореного продукту здійснюють одразу після додавання окисника без попереднього руйнування його залишку.

UA 98814 U

Корисна модель належить до аналітичної та фармацевтичної хімії, а саме способу кількісного визначення d(+)-Біотину (або Вітаміну Н, гексагідро-2-1Н-тієно[3,4-d]-імідазол-4-пентанової кислоти, в подальшому біотин) методом полярографії, і може бути використана у практиці центральних заводських лабораторій хімічних та фармацевтичних підприємств, лабораторій з контролю якості лікарських засобів, хіміко-токсикологічних лабораторій та аптечних установ.

Як відомо, біотин є полярографічно неактивною сполукою. Тому всі відомі способи полярографічного визначення біотину є непрямим - ґрунтуються на визначенні електрохімічної активності реагентів з якими взаємодіє біотин або зводяться до визначення добутих наперед його електрохімічно активних похідних.

Відомий спосіб кількісного визначення біотину на фоні 0,1 моль/л розчину калій хлориду за каталітичною хвилею виділення водню у далекій катодній ділянці обумовленою дисоціацією карбоксильної групи (потенціал півхвилі на фоні 0,1 моль/л розчину калій хлориду $E_{1/2} = -1,65$ В (відносно насиченого каломельного електроду (НКЕ))). Висоти хвиль пропорційні концентрації біотину в інтервалі $(2-20) \cdot 10^{-3}$ моль/л [Щевятнин В.А., Солунина І.А., Михно С.Д. Применение полярографического метода для анализа биотина и некоторых полупродуктов его синтеза // Химико-фармацевт. журнал.-1972. - Т. 6, № 8. - С. 35-38.]. Проте цей спосіб не вибірковий, оскільки хвилі виділення водню є нехарактерними для біотину. Крім того, вони відносно погано відтворюються, що обумовлює низьку чутливість та точність (ненадійність) способу.

Найбільш близьким аналогом є спосіб кількісного визначення біотину в розчинах методом полярографії, заснованим на попередньому добуванні за допомогою калій нітриту в присутності сульфатної кислоти нітрозопохідного біотину, руйнуванні надлишку нітрозуючого реагенту додаванням натрій ацетату та наступному відновленні утвореного нітрозопохідного біотину на ртутному мікроелектроді на фоні 0,5 моль/л розчину натрій ацетату, потенціал півхвилі $E_{1/2} = -0,83$ В (відносно НКЕ) [Davidek Jiri. Polzrographische Bestimmung von Biotin/ Die Naturwissenschaften. - 1961. - Jg. 48, № 10. - S. 403.]. Спосіб дозволяє здійснювати визначення біотину в розчинах, починаючи від концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л з відносною помилкою 3-4 %. Однак, він трудомісткий внаслідок довготривалого одержання нітрозопохідного біотину та необхідності руйнування залишку нітрозуючого реагенту, тому час, необхідний для здійснення аналізу однієї проби, становить не менше 40-45 хв, що робить спосіб непридатним для рутинних аналізів.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення простого та експресного способу полярографічного визначення біотину з використанням калій гідрогенпероксомоносульфату як окисника в умовах оптимального рН середовища.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі кількісного визначення біотину, що включає підготовку проби досліджуваного зразка шляхом додавання окисника в присутності кислоти з подальшим полярографуванням розчину утвореного деривату, згідно з корисною моделлю, як окисник використовують калій гідрогенпероксомоносульфат в кількості 1 до $1,1 \div 1,5$ -разового молярного співвідношення до 1 моль біотину ($10-50$ % молярного надлишку) по відношенню до аналіту в присутності $0,25$ моль/л розчину фосфатної кислоти для створення необхідного рН середовища в межах $1,4-1,5$, а полярографування здійснюють одразу після додавання окисника без попереднього руйнування його залишку за кімнатної температури, потенціал півхвилі $E_{1/2} = -1,05 \dots -1,1$ В (НКЕ).

Експериментально встановлено, що оптимальним для кількісного окисування біотину калій гідрогенпероксомоносульфатом у відповідний сульфоксид є рН $1,4-1,5$. Час кількісного виходу продукту - сульфоксиду біотину - практично миттєвий (час спостереження 1 хв). У межах від $1,1$ до $1,5$ молярного співвідношення до 1 моль біотину ($10-50$ % молярного надлишку) калій гідрогенпероксомоносульфату полярографічні характеристики відновлення сульфоксиду біотину не змінюються впродовж 30 хв. Однак, бажано, щоб концентрація калій гідрогенпероксомоносульфату у розчині не перевищувала 10^{-4} моль/л, оскільки через відновлення KHSO_5 (анодна ділянка полярограми) збільшується залишковий струм і дещо спотворюється фонові лінії полярограми (її катодна ділянка). На полярограмі хвиля відновлення сульфоксиду біотину зі збільшенням рН зміщується у катодну ділянку і при $\text{pH} > 3$ хвиля повністю зливається з такою відновлення фонового електроліту. Процес відновлення в умовах полярографування повністю необоротний: на анодній гілці полярограми взагалі відсутня хвиля. При рН $1,4$ (розчин $0,25$ моль/л фосфатної кислоти) на полярограмі пік простежувався при $-1,05 \dots -1,1$ (відносно НКЕ.) залежно від концентрації деполяризатора і був найвищим. За умов достатньо великого надлишку окисника (≥ 100 %) впродовж 7-10 хв у нейтральному або лужному середовищі ($\text{pH} \geq 7$) спостерігається подальше окиснення утвореного сульфоксиду

біотину до відповідного сульфонового похідного, який за умов полярографування в кислому середовищі (рН 1,4) є електрохімічно інертним (відсутність хвилі).

Сукупність ознак заявленого способу є новою, невідомою з джерел інформації.

Заявлений спосіб дозволяє швидко та просто визначати біотин, а відтак скоротити час виконання аналізу, принаймні у 2-3 рази (час здійснення аналізу становить 15-20 хв проти 40-45 хв у аалозі).

Спосіб здійснюють таким чином. Готують розчин проби досліджуваного зразка біотину шляхом розчинення точної наважки у етанолі, до якої додають 2,5 моль/л розчин фосфатної кислоти та $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату (виходячи з 10-50 % молярного надлишку) і доводили об'єм до 25 мл двічі дистильованою водою і переносили в електролізер, видаляли кисень впродовж 10 хв та полярографували від - 0,5 до - 1,5 В (НКЕ). Вимірювали граничне значення величини дифузійного струму отриманої хвилі ($E_{1/2} = -1,05 \dots -1,1$ В (НКЕ)).

Вміст біотину розраховують за наперед отриманим градувальним графіком.

Побудова градувального графіка. У мірні колби на 25 мл послідовно вносять від 0,25 мл до 1,25 мл $2,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л (25,0 мг/50 мл) розчину РСЗ біотину, додають у кожен по 2,5 мл 2,5 М фосфатної кислоти та 1,15 мл $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату. Доводять до позначки двічі дистильованою водою, переносять в електролізер, видаляють кисень впродовж 10 хв та полярографують. За даними граничних значень величин дифузійного струму будують концентраційну залежність I_{rp} , у мкА, від c , моль/л та методом найменших квадратів знаходять рівняння лінії Тренда ($I_{rp} = bc + a$).

Невідому концентрацію біотину в аналізованому розчині, у моль/л, знаходять за формулою:

$$c = \frac{I_{rp} - a}{b}.$$

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. Визначення біотину у спиртовому розчині або водному розчині питної соди 0,001 моль/л невідомої концентрації.

У мірну колбу на 25 мл вносять 1,00 мл випробуваного розчину біотину невідомої концентрації*, додають 2,5 мл 2,5 М фосфатної кислоти і 1,15 мл $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату, доводять до позначки двічі дистильованою водою, переносять в електролізер, видаляють кисень впродовж 10 хв та полярографують від - 0,5 до - 1,5 В (НКЕ). Вимірюють граничне значення величини дифузійного струму отриманої полярографічної хвилі ($E_{1/2} = -1,05 \dots -1,1$ В (НКЕ)). Вміст біотину розраховують за наперед отриманим градувальним графіком.

* Примітка. Виготовлення модельного розчину біотину (0,50 мг/мл). Наважку субстанції біотину, яка містила 0,0500 г основної речовини розчиняли у 100 мл етанолу або 0,001 моль/л водному розчині питної соди при 20 С.

Побудова градувального графіка. У мірні колби на 25 мл послідовно вносять 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл, 1,00 мл та 1,25 мл $2,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л (25,0 мг/50 мл) розчину РСЗ біотину, додають у кожен по 2,5 мл 2,5 моль/л фосфатної кислоти та 1,15 мл $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату. Доводять до позначки двічі дистильованою водою, переносять в електролізер, видаляють кисень впродовж 10 хв та полярографують. За даними граничних значень величин дифузійного струму будують концентраційну залежність I_{rp} у мкА від c , моль/л та методом найменших квадратів знаходять рівняння лінії Тренда ($I_{rp} = bc + a$). $I = (1,15 \pm 0,195) \times 10^4 c + (0,63 \pm 0,13)$.

Невідому концентрацію біотину в аналізованому розчині, у моль/л кінцевого об'єму, знаходять за формулою:

$$c_k = \frac{I_{rp} - a}{b}.$$

Результати кількісного визначення біотину у модельних розчинах наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

I Результати визначення біотину у модельних розчинах (n=5, P = 0,95)

Концентрація біотину у кінцевому об'ємі с, 10 ⁻⁵ (моль/л)	Знайдено ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x} \times 10^5$)	% \pm RSD	δ (%)
6,14*	6,17 \pm 0,26	102,7 \pm 3,4	0,49
8,19**	8,13 \pm 0,28	101,6 \pm 2,7	1,65

Примітки. *Вміст визначено за стандартною методикою [Бр. Ф 2009] (μ). $\delta = (\bar{x} - \mu) \times 100\% / \mu$;

** аналізували модельний розчин біотину, виготовлений на 0,001 моль/л розчині питної соди.

Приклад 2. Спосіб кількісного визначення біотину у таблетках по 5 мг Волвіт® (Kusum Healthcare Pvt. Ltd, India). Робочий дослід здійснюють таким чином.

- 5 Наважку порошку, розтертих 5 таблеток розчиняють у 50 мл етанолу, фільтрують на фільтрі з синьою стрічкою. Відбирають 1,00 мл розчину у мірну колбу на 25 мл, додають 2,5 мл 2,5 М фосфатної кислоти і 1,15 мл $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату, доводять до позначки двічі дистильованою водою, переносять в електролізер, видаляють кисень впродовж 10 хв та полярографують від - 0,5 до - 1,5 В (НКЕ). Вимірюють граничне значення величини дифузійного струму отриманої полярографічної хвилі ($E_{1/2} = - 1,05 \dots - 1,1$ В (НКЕ)). Вміст біотину розраховують за наперед отриманим градувальним графіком.

- 10 Побудова градувального графіка. У мірні колби на 25 мл послідовно вносять 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл, 1,00 мл та 1,25 мл $2,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л (25,0 мг/50 мл) розчину РСЗ біотину, додають у кожен по 2,5 мл 2,5 моль/л фосфатної кислоти та 1,15 мл $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату. Доводять до позначки двічі дистильованою водою, переносять в електролізер, видаляють кисень впродовж 10 хв та полярографують. За даними граничних значень величин дифузійного струму будують концентраційну залежність I_{rp} у мкА від с, моль/л та методом найменших квадратів знаходять рівняння лінії Тренда ($I_{rp} = bc + a$). $I = (1,15 \pm 0,195) \times 10^4$ с + $(0,63 \pm 0,13)$.

- 20 Невідому концентрацію біотину в аналізованому розчині у моль/л знаходять за формулою:

$$c = \frac{I_{rp} - a}{b}$$

Вміст біотину, у мг до однієї таблетки, розраховують за формулою:

$$m = \frac{\left(\frac{I_{rp} - a}{b}\right) \times 1000 \times 244,31 \times 25 \times 50 \times \bar{m}}{1000 \times m_H \times 1,00}$$

де, m_H - маса наважки досліджуваного зразка таблеток біотину, г;

- 25 \bar{m} - усереднена маса таблетки, г;

244,31 г/моль - молярна маса біотину;

25, 50 - об'єми мірних колб, мл;

1,00 - аліквотний об'єм випробуваного розчину, взятий на аналіз, мл;

a і b - коефіцієнти градувального графіка (вільний член та нахил);

- 30 1000, 1000 - коефіцієнти перерахунку маси біотину в мг та об'єму розчину до 1 мл відповідно.

Результати кількісного визначення біотину, у мг до однієї таблетки, в таблетках по 5 мг за способом корисної моделі наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати визначення біотину в таблетках по 5 мг Волвіт® (Kusum Healthcare Pvt. Ltd, India)
(n=5, P=0,95)

Вміст біотину (мг/ табл.)	Знайдено, мг $\bar{x} \pm \bar{x}$	% \pm RSD	δ (%)
5,0 (100,29 % $\begin{smallmatrix} +10\% \\ -10\% \end{smallmatrix}$)*	5,08 \pm 0,18	101,6 \pm 2,7	1,3

Примітки: μ^* - задекларовано у сертифікаті, знайдено за стандартною фармакопейною методикою; $\delta = (\bar{x} - \mu) \times 100\% / \mu$

Аналіз даних таблиць 1, 2 та регресійного аналізу (табл. 3) свідчить про те, що заявлений спосіб за метрологічними характеристиками відповідає вимогам Державної фармакопеї України щодо валідаційних показників правильності ($\delta < \text{RSD}$) та збіжності ($3 \text{ RSD} < 10\%$), а також лінійності ($r=0,996$).

Таблиця 3

Дані регресійного аналізу

Параметр	Значення
Межі лінійності (моль/мл)	$(3,6-10) \cdot 10^{-5}$
Рівняння градієнтного графіка *	$y = 1,15 \times 10^4 x + 0,63$
S_6	$6,131 \times 10^2$
$\pm S_6$	$0,95 \times 10^4$
S_a	0,04
$\pm S_a$	0,13
LOD (моль/л)	$1,1 \times 10^{-5}$
LOQ (моль/л)	$3,6 \times 10^{-5}$
* $y = 6 \times c + a$	

Отже, заявлено новий спосіб, який дозволяє здійснювати кількісне визначення біотину у вигляді відповідного сульфоксиду, добутого в попередній стадії аналізу, методом полярографії, спростити методику та скоротити час виконання аналізу.

Спосіб придатний для застосування у практиці центральних заводських лабораторій, хімічних та фармацевтичних підприємств, лабораторій з контролю якості лікарських засобів, хіміко-токсикологічних лабораторій та аптекних установ.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб кількісного визначення біотину, що включає підготовку проби досліджуваного зразка шляхом додавання надлишку окисника в присутності кислоти, з подальшим відновленням на ртутному мікроелектроді розчину утвореного похідного біотину, який **відрізняється** тим, що як окисник використовують калій гідрогенпероксомоносульфат в присутності 0,25 моль/л розчину фосфатної кислоти, а полярографування утвореного продукту здійснюють одразу після додавання окисника без попереднього руйнування його залишку.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601