



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **100303** (13) **U**  
(51) МПК (2015.01)  
**G01R 31/00**  
**C12P 13/12** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2014 13102</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Блажеєвський Микола Євстахійович (UA),</b> <b>Коретнік Оксана Іванівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>08.12.2014</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ</b> <b>УНІВЕРСИТЕТ,</b> вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>27.07.2015</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>27.07.2015, Бюл.№ 14</b>	

**(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МЕТІОНІНУ**

**(57) Реферат:**

Спосіб кількісного визначення метіоніну включає підготовку проби досліджуваного зразка шляхом додавання надлишку аналітичного реагенту в присутності буферної суміші на основі неорганічних кислот, з подальшим полярографуванням розчину утвореного похідного метіоніну. Як аналітичний реагент використовують калій гідрогенпероксомоносульфат у молярному співвідношенні до аналіту як 1 до 1,0-1,2, котрий застосовують в присутності 0,2 моль/л розчину фосфатної кислоти для створення необхідного рН середовища в межах 1,4-1,5, а полярографування здійснюють одразу після додавання аналітичного реагенту.

UA 100303 U



Корисна модель належить до аналітичної та фармацевтичної хімії, а саме способів кількісного визначення метіоніну 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 аптекних установ.

5 Як відомо, метіонін є полярографічно неактивною сполукою. Тому його кількісне визначення здійснюють непрямим методом: за каталітичною хвилею виділення водню, або зменшенням висоти хвилі відновлення катіонів металів при їх взаємодії з аналітом, або за кількістю полярографічно активного продукту взаємодії метіоніну з формальдегідом чи нінгідрином [Турьян Я.И. Химические реакции в полярографии. - М.: Химия, 1980. - 336 с. (С. 233-263).  
10 Жанталай Б.П., Турьян Я.И. Формальдегид как реагент при полярографическом определении аминокислот.- Ж. аналит. химии, 1968. - Т. 23, № 2. - С. 282-287. Мискиджьян С.П., Кравченко Л.П. Полярография лекарственных препаратов. - К.: Здоров'я, 1976. - С. 41-45, 118-120].

Огурцов зі співробітниками розробив методику полярографічного визначення метіоніну (0,01-0,1 мг/мл) в лікарських формах за зменшенням висоти хвилі відновлення катіонів  $Ni^{2+}$  при -1,14 В на фоні амоніакового буферного розчину з рН 9,7. Відносна помилка визначення метіоніну у субстанції та таблетках не перевищувала 2,65 %. Нижня межа визначення становила 10 мкг/мл [Огурцов В.В. Полярографічне визначення метіоніну в лікарських формах / В.В. Огурцов, Л.П. Яворська, Н.П. Сеньків // Фармац. журн. - 1983. - № 4. - С. 38-41].

Показана можливість здійснення кількісного визначення метіоніну за каталітичною передхвилею відновлення катіонів  $Ni^{2+}$  на фоні динарій тетраборат-нітратна кислота буферу з рН 8,6 в присутності  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л  $Ni$  (II). Використовуючи метод диференціальної імпульсної полярографії, можливе кількісне визначення метіоніну, починаючи з концентрації  $3 \cdot 10^{-6}$  моль/л [Lopez Fonseca J.M. Polarographic determination of methionine by measurement of the nickel (II) catalytic pre-wave / J.M. Lopez Fonseca, M.C. Arredondo //Analyst. - 1982. - V. 107. - P. 903-907].

25 Найбільш близьким за технічною суттю та досягнутим результатом до заявленого є спосіб кількісного визначення метіоніну у розчинах методом постійнострумової полярографії, заснованим на попередньому добуванні за реакцією з формальдегідом (формаліном) при рН 8,2 в середовищі універсальної буферної суміші фосфатної, ацетатної, боратної кислот (0,04 моль/л стосовно кожної з них) з натрій гідроксидом (86 мл 0,2 моль/л розчину до 100 мл суміші)  
30 його N-метиленового (монометилпольного) похідного, що містить азометинову групу  $-N=CH_2$ ), з наступним відновленням на ртутному крапельному електроді (р.к.е.) при більш позитивних потенціалах, ніж сам формальдегід. Пробу, котра містить не більше  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л метіоніну, поміщали у мірну колбу на 100 мл, додавали 10 мл (10-разового надлишку) універсальної буферної суміші з рН 8,2 та 1,4 мл 25 % розчину формальдегіду (кінцева концентрація 0,2 моль/л) та доводили до позначки дистильованою водою. Розчини полярографували та, за отриманим значенням усередненої величини граничного струму при  $E_{1/2} \approx -1,2$  В та значення величини нахилу його концентраційної залежності  $K = 1,54$  мка·л/ммоль, розраховували концентрацію амінокислоти в розчині [Жанталай Б.П. Полярографическое определение метионина и цистеина в смеси / Биохимия. - 1964. - Т. 29, № 6. - С. 1009-1011].

40 Спосіб дозволяє здійснювати визначення метіоніну в розчинах, починаючи за даними автора, від концентрації  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л і вище з відносною помилкою 5 %. Однак він трудомісткий, займає багато часу на виготовлення універсальної буферної суміші, яка складається з трьох неорганічних кислот (фосфатної, боратної та ацетатної), а також включає використання відносно токсичного аналітичного реагенту - формаліну, який має канцерогенну дію, має низьку чутливість: нахил концентраційної залежності граничного струму становить всього 1,54 мка·л/ммоль.

В основу корисної моделі поставлена задача створення простого, чутливого та безпечного способу полярографічного визначення метіоніну, шляхом використання невеликого надлишку калій гідрогенпероксомоносульфату як аналітичного реагенту та забезпечення оптимального рН середовища за допомогою фосфатної кислоти.

50 Поставлена задача вирішується тим, що у способі кількісного визначення метіоніну, що включає підготовку проби досліджуваного зразка шляхом додавання надлишку аналітичного реагенту в присутності буферної суміші на основі неорганічних кислот, з подальшим полярографуванням розчину утвореного деривату, згідно з корисною моделлю, на відміну від прототипу, як аналітичний реагент використовують калій гідрогенпероксомоносульфат у молярному співвідношенні до аналіту як 1 до 1,0-1,2 (0-20 % його молярного надлишку), котрий застосовують в присутності 0,2 моль/л розчину фосфатної кислоти для створення необхідного рН середовища в межах 1,4-1,5, а полярографування здійснюють одразу після додавання аналітичного реагенту.

60 Вміст метіоніну розраховують за наперед отриманим градувальним графіком.

Експериментально встановлено, що оптимальним для кількісного окисдування D, L-метіоніну калій гідрогенпероксомоносульфатом у відповідний сульфоксид є рН 1,2-4. Час кількісного виходу продукту - сульфоксиду D, L-метіоніну - повинен бути не менший 30 с. За умов застосування як аналітичного реагенту калій гідрогенпероксомоносульфату в межах від 1 до 1,2-разового молярного співвідношення стосовно метіоніну (від 0 до 20 % молярного його надлишку) полярографічні характеристики відновлення сульфоксиду D, L-метіоніну не змінюються. Однак, бажано, щоб концентрація калій гідрогенпероксомоносульфату у розчині не перевищувала  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л, оскільки через відновлення  $\text{KHSO}_5$  (анодна ділянка полярограми) збільшується залишковий струм і дещо спотворюється фонові лінії полярограми (її катодна ділянка). На циклічній полярограмі потенціал піку відновлення сульфоксиду D, L-метіоніну зі збільшенням рН зміщується у катодну ділянку і при рН > 3 хвиля повністю зливається з такою відновлення фоновому електроліту. Тому, для забезпечення найбільших струмів відновлення сульфоксиду D, L-метіоніну рН суміші після окисдування зменшували до 1,4, додаючи розчин фосфатної кислоти. При рН 1,4 (розчин 0,2 моль/л фосфатної кислоти) на полярограмі пік простежувався при -1,1....-1,2 (відносно н.к.е.) залежно від концентрації деполяризатора і був найвищим.

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

Заявлений спосіб, згідно з корисною моделлю, дозволяє спростити здійснення аналізу, підвищити чутливість визначення метіоніну принаймні у 10 разів (нахил концентраційної залежності граничного струму становить 19,3 мкА·л/ммоль проти 1,54 мкА·л/ммоль у прототипі) та створити безпечні умови праці.

Корисну модель виконують таким чином. Готують розчин проби досліджуваного зразка метіоніну шляхом розчинення точної наважки у двічі дистильованій воді, розбавлення розчину, до якого додають 2 моль/л розчин фосфатної кислоти та  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л розчин калій гідрогенпероксомоносульфату (виходячи з 0-20 % молярного надлишку стосовно метіоніну), витримують до завершення взаємодії та доводять об'єм до позначки двічі дистильованою водою при 20 °С і переносять в електролізер, видаляють кисень впродовж 10 хв та полярографують від - 0,5 до - 1,5 В (відносно н.к.е.). Вимірювали граничне значення величини дифузійного струму отриманої хвилі ( $E_{1/2} = -1,1....-1,2$  В (відносно н.к.е.)).

Вміст метіоніну розраховують за наперед отриманим градувальним графіком.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. Побудова градувального графіка. Наважку D, L-метіоніну, яка відповідає вмісту D, L-метіоніну 0,14921 г, розчиняють у мірній колбі на 100 мл у 50 мл дистильованої води при нагріванні і доводять об'єм до позначки двічі дистильованою водою. Отриманий розчин розбавляють точно у 10 разів двічі дистильованою водою. За допомогою піпетки відбирають від 2,00 до 20,00 мл (не менше 5-7 об'ємів) отриманого розчину і почергово переносять у мірні колби на 100 мл, додають у кожну такі ж об'єми (від 2,00 до 20,00 мл) 0,001 моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату і ще додатково по 1 мл такого ж розчину при збовтуванні та по 10 мл 2 моль/л розчину фосфатної кислоти, витримують не менше 30 с, об'єм доводять до позначки двічі дистильованою водою при 20 °С і ретельно перемішують. Розчини почергово переносять до електролізера, пропускають аргон через розчин впродовж 10-15 хв і полярографують. На полярограмах відмічають хвилі відновлення сульфоксиду D, L-метіоніну ( $E_{1/2} \approx -1,1....-1,2$  В стосовно н.к.е.) і за усередненими результатами з трьох паралельних визначень будують графік залежності висоти полярографічного піку (мкА) від кінцевої концентрації D, L-метіоніну (моль/л). Рівняння градувального графіка має вигляд:  $I = (19,30 \pm 0,95) \cdot 10^3 c + (0,17 \pm 0,10)$ , коефіцієнт кореляції  $r=0,999$ ). Дані регресійного аналізу градувальної залежності представлені в таблиці 1.

Таблица 1

Дані регресійного аналізу

Параметр	Значення
Потенціал напівхвилі (В)	$\approx -1,1$ (н.к.е.)
LOD	$5,48 \cdot 10^{-6}$
LOQ (моль/л)	$1,83 \cdot 10^{-5}$
Інтервал визначуваних концентрацій (моль/л)	$2,0 \cdot 10^{-5} - 2,0 \cdot 10^{-4}$
Рівняння регресії*	$I = (19,30 \pm 0,95) \cdot 10^3 c + (0,17 \pm 0,10)$
Нахил (b)	$19,30 \cdot 10^3$
Перетин (a)	0,17
$S_b$	341,48
$S_a$	0,035
Коефіцієнт кореляції (r)	0,999

\*  $I = bc + a$ , де  $c$  - концентрація аналіту, моль/л,  $I$  - значення величини дифузійного струму, мкА

Наважку модельної суміші таблеток: 149,21 мг D, L-метіоніну, 60,0 мг тальку, 60,0 мг аеросилу, 12,0 мг крохмалю та 6,0 мг Понсо 4 R розчиняють у мірній колбі на 100 мл у 50 мл двічі дистильованої води при нагріванні не вище  $+40^\circ\text{C}$  і, охолодивши до  $+20^\circ\text{C}$ , доводять об'єм до позначки двічі дистильованою водою. Отриманий розчин розбавляють точно у 10 разів двічі дистильованою водою. За допомогою піпетки відбирають 1,00 або 5,00 або 8,00 мл (не менше 5 разово) новоотриманого розчину і почергово переносять у мірні колби на 100 мл, додають у кожен такі ж об'єми 0,001 моль/л розчину калій гідрогенпероксидомоносульфату і ще додатково по 0 мл, 1,0 мл та 0,8 мл такого ж розчину при збовтуванні, витримують не менше 30 с, додають по 10 мл 2 моль/л розчину фосфатної кислоти, об'єм доводять до позначки двічі дистильованою водою при  $20^\circ\text{C}$  і ретельно перемішують. Розчини почергово переносять до електродлізера, пропускають аргон через розчин впродовж 10-15 хв і полярографують. На полярограмах відмічають хвилі відновлення сульфоксиду D, L-метіоніну ( $E_{1/2} \approx -1,1 \dots -1,2$  В стосовно н.к.е.) і за усередненими результатами з п'яти паралельних висот полярографічного піку (мкА) розраховують вміст метіоніну в кінцевому розчині, у моль/л.

Результати полярографічного визначення D, L-метіоніну за способом корисної моделі у модельних сумішах готової лікарської форми (таблеток) метіоніну на трьох рівнях концентрацій в присутності нормованої кількості допоміжних речовин за умов різного надлишку аналітичного реагенту 0-20 % представлені в таблиці 2. Методом "уведено-знайдено" показана відсутність систематичної похибки ( $\delta < \text{RSD}$ ). Встановлено, що допоміжні речовини (тальк, аеросил, барвник Понсо 4R), які входять до складу готової лікарської форми, не заважають аналізу. При визначенні метіоніну в модельній суміші  $\text{RSD} \leq 2,63\%$ . Правильність,  $\delta = -0,15 \dots +0,15\%$ .

Таблица 2

Метрологічні характеристики результатів визначення D, L-метіоніну у модельних зразках таблеток (0,2500 г D, L-метіоніну, 100 мг тальку, 100 мг аеросилу, 20 мг крохмалю та 10 мг Понсо 4 R) ( $n=5$ ,  $P = 0,95$ )

Уведено D, L-метіоніну, моль/л	Знайдено концентрацію D, L-метіоніну, моль/л	Метрологічні характеристики
$1,00 \cdot 10^{-4}$		$\bar{x} = 1,01 \cdot 10^{-4}$
	$1,00 \cdot 10^{-4}$	$s = 2,11 \cdot 10^{-6}$
	$0,985 \cdot 10^{-4}$	$s_{\bar{x}} = 7,97 \cdot 10^{-7}$
	$1,00 \cdot 10^{-4}$	$\Delta \bar{x} = 1,95 \cdot 10^{-6}$
	$1,01 \cdot 10^{-4}$	$\text{RSD} = 2,09\%$
	$1,04 \cdot 10^{-4}$	$\epsilon = 1,93\%$ ( $\delta = 0,94\%$ )

$8,0 \cdot 10^{-5}$		$\bar{x} = 8,0 \cdot 10^{-5}$
	$8,0 \cdot 10^{-5}$	$s = 1,79 \cdot 10^{-6}$
	$7,8 \cdot 10^{-5}$	$s_{\bar{x}} = 6,77 \cdot 10^{-7}$
	$7,95 \cdot 10^{-5}$	$\Delta \bar{x} = 1,66 \cdot 10^{-6}$
	$8,0 \cdot 10^{-5}$	RSD=2,24 %
	$8,3 \cdot 10^{-5}$	$\varepsilon = 2,07 \% (\delta = 0,15 \%)$
$5,0 \cdot 10^{-5}$		$\bar{x} = 4,9 \cdot 10^{-5}$
	$4,9 \cdot 10^{-5}$	$s = 1,29 \cdot 10^{-6}$
	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$s_{\bar{x}} = 4,86 \cdot 10^{-7}$
	$4,9 \cdot 10^{-5}$	$\Delta \bar{x} = 1,19 \cdot 10^{-6}$
	$4,9 \cdot 10^{-5}$	RSD=2,63 %
	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$\varepsilon = 2,43 \% (\delta = -2,07 \%)$

Приклад 2. Побудова градувального графіка. Наважку D, L-метіоніну, яка відповідає вмісту D, L-метіоніну 0,14921 г, розчиняють у мірній колбі на 100 мл у 50 мл дистильованої води при нагріванні і доводять об'єм до позначки двічі дистильованою водою. Отриманий розчин розбавляють точно у 10 разів двічі дистильованою водою. За допомогою піпетки відбирають від 2,00 до 20,00 мл (не менше 5-7 об'ємів) новоотриманого розчину і почергово переносять у мірні колби на 100 мл, додають у кожну такі ж об'єми (від 2,00 до 20,00 мл відповідно) 0,001 моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату і ще додатково по 0,4-1 мл такого ж розчину при збовтуванні, витримують не менше 30 с, додають по 10 мл 2 моль/л розчину фосфатної кислоти, об'єм доводять до позначки двічі дистильованою водою при 20 °С і ретельно перемішують. Розчини почергово переносять до електролізера, пропускають аргон через розчин впродовж 10-15 хв і полярографують. На полярограмах відмічають хвили відновлення сульфоксиду D, L-метіоніну ( $E_{1/2} \approx -1,1 \dots -1,2$  В стосовно н.к.е.) і за усередненими результатами з трьох паралельних визначень будують графік залежності висоти полярографічного піку (мкА) від кінцевої концентрації D, L-метіоніну (моль/л). Рівняння градувального графіка має вигляд:  $I = (19,30 \pm 0,95) \cdot 10^3 c + (0,17 \pm 0,10) r = 0,999$ .

Методика кількісного визначення метіоніну у таблетках. Близько 0,28 г (точна наважка) порошку розтертих таблеток розчиняють у мірній колбі на 100 мл у 50 мл дистильованої води при нагріванні і доводять об'єм до позначки двічі дистильованою водою, фільтрують через паперовий фільтр з червоною стрічкою. Отриманий розчин розбавляють точно у 10 разів двічі дистильованою водою. За допомогою піпетки відбирають 10,00 мл новоотриманого розчину і переносять у мірну колбу на 100 мл, додають 10,00 мл 0,001 моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату і ще додатково 2 мл такого ж розчину при збовтуванні, 10 мл 0,2 моль/л розчину фосфатної кислоти і об'єм доводять до позначки двічі дистильованою водою при 20 °С. Наповнюють електролізер, пропускають аргон через розчин впродовж 10-15 хв і знімають полярограму, починаючи з - 0,4 до - 1,5 В (н.к.е.). Вимірюють значення величини піку в мм і перераховують в мкА.

Вміст D, L-метіоніну у таблетках X, у г, розраховують за формулою:

$$X = \frac{(I - a) \cdot M \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100 \cdot \bar{m}}{b \cdot m_n \cdot 1000},$$

де,  $m_n$  - маса наважки порошку розтертих таблеток, г;  $\bar{m}$  - середня маса таблетки (0,465 г); 10, 10 - коефіцієнти розбавлення, г; 100 - об'єм мірної колби, мл; I - висота полярографічної хвили, мкА; a (перетин) та b (нахил) - коефіцієнти лінії регресії I (мкА) на c розчину PC3 метіоніну (моль/л); M - молярна маса D, L-метіоніну, 149,21 г/моль.

При визначенні D, L-метіоніну в таблетках по 0,25 г (ПАТ "Київський вітамінний завод" (Київ, Україна) за опрацьованою методикою для знайденого середнього 98,8 % ( $n=7$ ,  $P = 0,95$ ) RSD=1,65 %. Запропонована методика полярографічного визначення D, L-метіоніну дозволяє отримувати правильні результати ( $\delta = 0$  (розрахована за даними середнього з сертифікату) < RSD).

Межа кількісного визначення (LOQ) D, L-метіоніну, визначена за 10S критерієм становить  $1,83 \cdot 10^{-5}$  моль/л.

Отже, заявлено спосіб, який дозволяє здійснювати кількісне визначення метіоніну методом полярографії у вигляді відповідного сульфоксиду, спростити методику, підвищити чутливість та створити безпечні умови праці.

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

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб кількісного визначення метіоніну, що включає підготовку проби досліджуваного зразка шляхом додавання надлишку аналітичного реагенту в присутності буферної суміші на основі неорганічних кислот, з подальшим полярографуванням розчину утвореного похідного метіоніну, який **відрізняється** тим, що як аналітичний реагент використовують калій гідрогенпероксомоносульфат у молярному співвідношенні до аналіту як 1 до 1,0-1,2, котрий
- 15 застосовують в присутності 0,2 моль/л розчину фосфатної кислоти для створення необхідного рН середовища в межах 1,4-1,5, а полярографування здійснюють одразу після додавання аналітичного реагенту.

---

Комп'ютерна верстка В. 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