

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ**

**ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА АНАЛІТИЧНОЇ, ФІЗИЧНОЇ ТА КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ**

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Кількісне визначення таурину у дієтичних добавках
спектрофотометричним методом аналізу»**

Виконала: здобувач вищої освіти 3-го курсу, групи
118Б2Б напряму підготовки 22 «Охорона здоров'я»
Спеціальності 226 «Фармація, промислова
фармація», освітня програма «Фармація»
Бартманська Влада Вадимівна
Керівник: кандидат педагогічних наук, доцентка
Чхало Оксана Миколаївна

Рецензент: кандидат хімічних наук,
доцентка кафедри ліків та лікарської токсикології
Головченко Оксана Іванівна

Київ – 2024

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	4
Вступ.	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.	8
РОЗДІЛ 1. Таурин, методи визначення.	
1.1 Роль таурину в організмі та його застосування в медицині та фармації.	8
1.2 Будова, фізико-хімічні властивості та отримання таурину.	10
1.3 Методи ідентифікації таурину.	12
1.4 Методи кількісного визначення таурину.	12
1.5 Спектрофотометричний метод аналізу.	13
РОЗДІЛ 2. Експериментальна частина.	15
2.1. Матеріали та методи.	15
2.1.1. Мета дослідження.	15
2.1.2. Об'єкти дослідження.	15
2.1.3. Посуд та обладнання.	16
2.1.4. Реактиви.	16
2.1.5. Приготування випробуваного розчину.	17
2.1.6. Приготування 0,1%-го спиртового розчину 2,4-динітрохлорбензену.	17
2.1.7. Приготування стандартного розчину таурину та серії стандартних розчинів таурину.	17
2.2. Методика проведення спектрофотометричного визначення.	17
РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення.	19
3.1. Побудова спектру поглинання, визначення оптимальної довжини хвилі спектрофотометричного поглинання.	19
3.2. Вплив температури та часу нагрівання.	20
3.3. Побудова калібрувального графіка залежності оптичної	22

	густини А від концентрації таурину. Визначення лінійності залежності.	
3.4.	Кількісне визначення таурину у дієтичних добавках. Оцінка валідаційних характеристик.	25
3.4.1.	Оцінка специфічності методики.	25
3.4.2.	Прецизійність та робасність.	25
3.4.3.	Правильність.	29
3.5.	Порівняльний аналіз методик кількісного визначення таурину.	30
	Висновки.	31
	Список використаних джерел.	32
	Додатки.	34
	Summary.	39

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

БАД – біологічно активна добавка

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ДФУ – державна фармакопея України

ФСЗ – Фармакопейні стандартні зразки

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

ISO – міжнародна організація зі стандартизації

ЛЗ – лікарський засіб

мг – міліграм

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

С⁰ – градуси Цельсія

ВСТУП

Таурин - це сірковмісна амінокислота, що утворюється в організмі при перетворенні цистеїну. В організмі він синтезується в невеликих кількостях, а витрачається досить швидко і його витрата збільшується в кілька разів під час будь-яких навантажень – чи то фізичних, чи розумових, чи при нервовому перенапруженні. Відповідно такі витрати призводять до його дефіциту.

В організмі людини таурин виконує багато функцій і, насамперед, надає антиоксидантний ефект, тобто захищає клітини від негативного впливу вільних радикалів, гальмує окислювальні процеси і прискорює процес регенерації на клітинному рівні [2]. Таурин позитивно впливає на серцево-судинну систему: регулює роботу серця, приводить в норму кров'яний тиск, покращує стан кровоносних судин, що знижує ризик захворювань серцевого м'яза. Після підвищених фізичних навантажень він нормалізує роботу кровоносної системи.

Також відомо про користь таурину для мозку. Він сприяє створенню нових нейронних зв'язків, допомагає боротися з втомою, підвищує розумову активність, бере активну участь в утворенні клітин головного мозку у зоні, що відповідає за пам'ять.

Серед інших позитивних дій на організм людини можна назвати такі: регулює рівень глюкози в крові, стимулює репаративні процеси при дистрофічних порушеннях сітківки, покращує обмінні процеси в тканинах ока, приймає участь в метаболічних процесах, регулює роботу жовчовивідної системи, знижує ризик розвитку онкологічних захворювань, він має протисудомну активність і ліки з таурином застосовують при лікуванні епілепсії, безсоння, нервових зривів, синдромів емоційного та професійного вигоряння.

В косметології також не обходяться без таурину. Він посилює живлення та дихання тканин шкіри, підвищує її тонус та регенерацію, знімає запалення, сприяє швидкому загоєнню прищів та подряпин.

Отже, негативні наслідки нестачі таурину в організмі зрозумілі і, щоб уникнути цих негативних наслідків, потрібно вживати продукти, які збагачені таурином або спеціальні добавки, хоча вживання дієтичних добавок може бути пов'язано з певним ризиком через відсутність належного контролю за якістю і тим, що часто дозування препарату не завжди відповідає заявленому.

Актуальність: Пошук нових методик кількісного визначення таурину в дієтичних добавках.

Мета: розробити методику кількісного визначення таурину у дієтичних добавки Таукард (виробник ТОВ Астрафарм, Україна) та Таурин Кардіо (виробник Biodeal Pharmaceuticals Private Limited, Індія) спектрофотометричним методом аналізу.

Завдання:

1. Проаналізувати літературні дані щодо застосування таурину, його фізико-хімічні та фармакологічні властивості, метаболізм та механізм дії таурину.

2. Проаналізувати методики кількісного визначення таурину.

Використовуючи дані проведених досліджень розробити методику кількісного визначення таурину у дієтичних добавках Таукард (виробник ТОВ Астрафарм, Україна) та Таурин Кардіо (виробник Biodeal Pharmaceuticals Private Limited, Індія) спектрофотометричним методом аналізу.

3. Здійснити валідацію методики кількісного визначення таурину у дієтичних добавках методом спектрофотометричним методом аналізу.

Предмет дослідження: Спектрофотометричний аналіз та його застосування для кількісного визначення складу дієтичних добавок.

Новизна та значення одержаних результатів: У результаті проведеної роботи була запропонована нова альтернативна сучасна методика кількісного визначення таурину у дієтичних добавках.

Апробація результатів дослідження. Результати роботи були представлені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету, 19-20.12.2023 (Додаток 5).

Структура роботи. Робота включає Таблиць -7, Рисунків – 6, Додатків – 5, загальний обсяг 40 сторінок.

ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Таурин, методи визначення.

1.1. Роль таурину в організмі та його застосування.

Для діагностики, профілактики та лікування великої кількості захворювань використовуються як лікарські засоби, так і дієтичні добавки, що містять у своєму складі амінокислоти. Вміст амінокислот в біологічних рідинах організму підтримується на постійному рівні. Зміна у вмісті амінокислот в організмі свідчить про наявні порушення його функції.

Відомо, що більшість амінокислот мають широкий ряд біологічної активності. Таурин (2-аміноетансульфонова або тауринова кислота) – це замінна амінокислота, що міститься в міокарді, лімфоцитах, а також у нервовій, очній та інших тканинах організму, у внутрішньоклітинних депо скелетних та гладких м'язів, в крові та в жовчі людини та ссавців. Вперше таурин було виділено німецькими медиками ще на початку XIX століття із жовчі бика звідки і пішла його назва (taurus – бик (лат.)) [1].

Таурин бере участь в метаболічних процесах вуглеводного та білкового обміну, підтримці гомеостазу внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію та натрію, в регуляції клітинного об'єму. Відома роль таурину в формуванні жовчних кислот та регуляції ліпідного обміну - прискорює засвоєння жирів у кишківнику. Він також має кардіотонічну та гепатопротекторну властивості. Тому його призначають при стенокардії, серцевій недостатності, хворобах печінки, жовчного міхура та підшлункової залози. Таурин покращує еластичність стінок артерій, таким чином сприяє зниженню кров'яного тиску, позитивно впливає на загальний холестерин в крові, знижує рівень тригліцеридів, завдяки чому запобігає прогресу атеросклерозу, отже знижує ризик розвитку серцево-судинних хвороб таких як гіпертензії.

Таурин допомагає в стабілізації рівня цукру у хворих на цукровий діабет 1-го та 2-го типу. Для хворих на цукровий діабет роль таурину важко переоцінити. Він підвищує чутливість до інсуліну, прискорює виведення з

крові холестерину низької щільності, перешкоджає утворенню гіперхолестеринемії та відкладення жирових депо в артеріях, знижує рівень тригліцеридів, допомагає зменшувати жировий прошарок навколо внутрішніх органів, діє як сечогінний засіб, гальмує вироблення глікогену у відповідь на підвищення глюкози в плазмі крові, гальмує розвиток діабетичної нефропатії. Концентрація таурину у крові хворих на цукровий діабет часто нижча від норми, можливо тому вони більш сприйнятливі до серцевих захворювань та ретинопатії. Тому діабетикам радять регулярно вживати в їжу продукти, які містять таурин, а також приймати дієтичні добавки, що містять тауринову кислоту.

Таурин також відновлює обмінні процеси при дистрофічних порушеннях сітківки та дегенерації тканин ока, які виникли через патологічні процеси або фізичні травми.

Приймати таурин рекомендують і спортсменам. Він підвищує фізичну активність, працездатність та енергетичний потенціал, знижує втомлюваність і збільшує витривалість для досягнення гарних спортивних результатів. Багато реабілітологів та спортивних лікарів вважають, що регулярний прийом таурину допомагає швидше відновитися, збільшує стійкість до стресів, зберігає здоров'я спортсменів. Також його призначають для профілактики судом [1].

В косметології таурин використовують в приготуванні коктейлів для процедури мезотерапії для перешкоджання зневоднення шкіри і, відповідно, запобігання появі зморшок та навіть розгладження уже наявних невеликих зморшок.

Відомо, що практично неможливо зашкодити організму навіть при прийомі великої кількості таурину, проте існують деякі протипоказання до його застосування та побічні ефекти при передозуванні. Серед побічних ефектів, які самі проходять через добу, можна назвати головний біль, тривожний стан та погане загальне самопочуття. Протипоказаннями є непереносимість дієтичної добавки та алергія на будь-які допоміжні

речовини, ниркова недостатність, виразка шлунку, підвищена кислотність в шлунку та гастрит. Вагітним також не призначають дієтичні добавки, що містять таурин, через відсутність інформації щодо його впливу на розвиток плоду.

Таурин синтезується в організмі з метіоніну та цистеїну в присутності вітаміну В6, але, порівняно з іншими ссавцями, людина має невисокі можливості його синтезу, тому основним джерелом таурину є їжа [3]. Велика кількість таурину міститься в м'ясі кролика, в курячих та яловичих печінці та серці, червоній рибі, але в продуктах рослинного походження він практично відсутній. Тому підтримувати його необхідний рівень в організмі простіше за допомогою дієтичних добавок, які є у вільному продажі у вигляді таблеток, порошків, капсул та гелів.

Таурин також використовують в якості інгредієнта в енергетичних напоях, де може міститись від 1000 мг таурину на порцію та більше 2000 мг. Таурин додають в напої як депресанта нервової системи. За даними Європейських інститутів оцінки ризику безпечний вміст таурину в енергетичних напоях складає 4000 мг/л.

1.2. Будова, фізико-хімічні властивості та отримання таурину.

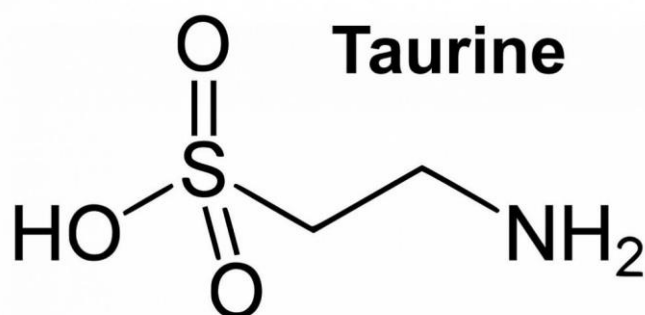


Рис.1. Таурин [1].

За IUPAC речовина має назву 2-аміноетансульфонова кислота

Молекулярна формула: $C_2H_7NO_3S$

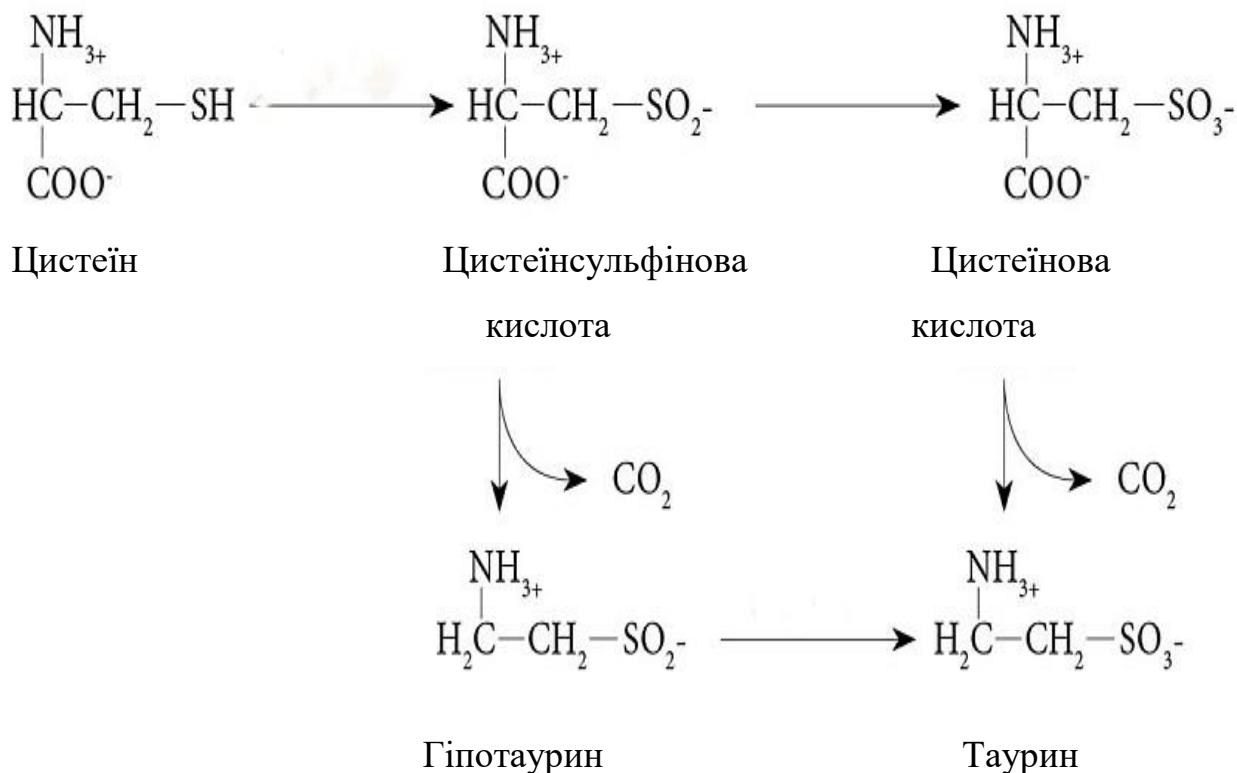
Молярна маса: 125,14 г/моль

Густина: 1,734 г/см³ [4].

Таурин – добре розчинний у воді білий кристалічний порошок, який не розчиняється в органічних розчинниках. Його температура плавлення 329⁰С. [5].

Основним джерелом надходження таурину в організм здорової людини є продукти харчування, та високі концентрації його містяться в продуктах тваринного походження з кулінарною обробкою, яка передбачає мінімізацію втрати води. Вегетаріанці, відповідно, мають нижчий рівень таурину, ніж люди, що вживають продукти тваринного походження. Метіонін та цистеїн є попередниками таурину в організмі, але швидкість його синтезу невідома.

Схема біосинтезу таурину включає окислення цистеїну в цистеїнсульфінову кислоту, декарбоксилювання в гіпотаурин та подальше окислення в таурин (Рис.2.).



В основному ендогенний таурин синтезується в печінці і мозку.

1.3. Методи ідентифікації таурину.

В ДФУ та Європейській фармакопеї відсутня стаття щодо таурину. Для його ідентифікації з літературних джерел відомі наступні методи:

1. За ІЧ-спектром досліджуваної субстанції, який має відповідати спектру фармакопейного стандартного зразка (ФСЗ) таурину.
2. Якісна реакція: до розчину субстанції додають розчин натрію гідроксиду та фенолфталеїну. Малинове забарвлення, яке при цьому з'являється, зникає при додаванні розчину формальдегіду (попередньо нейтралізованого за фенолфталеїном).
3. Якісна реакція: певну кількість субстанції поміщують в тигель, розчиняють в суміші калію нітрату з концентрованою нітратною кислотою. Після чого озолують спочатку на електричній плитці, потім в муфельній печі при 600⁰С. До отриманого білого залишку додають невелику кількість води, розведену хлоридну кислоту та розчин барій хлориду. При цьому має утворитись білий осад, який не розчиняється в розбавлених мінеральних кислотах.

1.4. Методи кількісного визначення таурину.

З літературних джерел відомі декілька методів кількісного визначення таурину. Один із них – метод кислотно-основного титрування (формольне титрування): наважку субстанції розчиняють у воді, додають розчин формальдегіду та титрують розчином натрій гідроксиду. В якості індикатора використовують розчин фенолфталеїну. Або проводять формольне титрування з фіксацією точки еквівалентності потенціометричним методом. Недоліком цього методу є низька його селективність, що ускладнює кількісне визначення таурину в комплексних засобах.

Ще одним методом кількісного визначення таурину, згідно з літературними джерелами [6], є метод вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням 1-фтор-2,4-динітробензолу в якості реагента та метод ВЕРХ з передколонковою дериватизацією 2,4-

динітрохлорбензолом [7]. Недоліком даного методу є довготривала пробопідготовка та велика кількість реактивів.

Відомий також спектрофотометричний метод кількісного визначення аліфатичних амінокислот шляхом обробки досліджуваного зразка 1% спиртовим розчином нінгідрину в середовищі фосфатного буферного розчину в присутності аскорбінової кислоти. Недоліком цього методу також є його низька селективність при визначенні в комбінованих препаратах (наприклад, з хітозаном та алантоїном).

1.5. Спектрофотометричний метод аналізу.

Спектрофотометричний метод аналізу, або просто спектрофотометрія, - це фізико-хімічний метод аналізу, який ґрунтується на вибіркового поглинанні речовиною монохроматичного світла з відповідною довжиною хвилі [8]. Метод заснований на вимірюванні спектрів поглинання і може застосовуватись в видимій (380-750 нм), ультрафіолетовій (10-380 нм) та інфрачервоній (0,75- 300 мкм) областях спектра. Спектр поглинання – це залежність оптичної густини від довжини хвилі, він, як правило, має максимум поглинання, за яким можна визначити, які речовини знаходяться в досліджуваному розчині. Спектрофотометричний метод застосовується для аналізу як однієї речовини в розчині, так і багатокомпонентної системи. Цей метод дозволяє працювати не тільки з забарвленими розчинами, що поглинають світло у видимій ділянці спектру, але і з прозорими розчинами, які поглинають випромінювання в УФ- або ІЧ- областях спектра. Спектрофотометрія в ультрафіолетовій області широко використовується для аналізу органічних сполук. Всі органічні молекули поглинають ультрафіолетове випромінювання що зумовлено наявністю в будові речовин хромофорних (поглинаючих) груп атомів.

Спектрофотометричні методи мають високу чутливість та вибіркковість. За їх допомогою можна визначати малі кількості речовин з досить великою точністю. Кількісні визначення в спектрофотометрії проводять графічним методом та методом добавок. Вимірювання оптичної густини досліджуваних

розчинів проводять на спектрофотометрах відносно розчинника або розчину порівняння, який не містить визначувану речовину. Залежність між оптичною густиною і концентрацією досліджуваної речовини підпорядковується закону Бугера – Ламберта – Бера, за яким оптична густина розчину прямо пропорційна концентрації розчину і товщині поглинаючого шару.

$$A = K \cdot C \cdot l$$

A — оптична густина

K — коефіцієнт пропорційності;

C — концентрація речовини у розчині;

l — товщина шару розчину, через який проходить світло [9].

Для визначення концентрації речовини в розчині потрібно виконати наступні дії:

- приготувати серію стандартних розчинів з відомою концентрацією визначуваної речовини;
- приготувати розчин порівняння;
- зняти спектр поглинання та обрати оптимальну довжину хвилі для наступних вимірювань і побудови калібрувального графіка;
- виміряти оптичну гуστину приготовлених стандартних розчинів і побудувати калібрувальний графік залежності оптичної густини розчинів від концентрації визначуваної речовини.

Після чого виміряти оптичну гуστину досліджуваних розчинів та за калібрувальним графіком визначити концентрацію визначуваної речовини.

Розділ 2. Експериментальна частина.

Випускна кваліфікаційна робота була виконана на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження. Метою роботи є розробка методики кількісного визначення таурину у дієтичних добавках спектрофотометричним методом аналізу.

2.1.2. Об'єкти дослідження. Для розробки методики було обрано дієтичні добавки Таукард (виробник ТОВ Астрафарм, Україна) та Таурин Кардіо (виробник Biodeal Pharmaceuticals Private Limited, Індія). Дієтичні добавки реалізуються аптеками в таблетках та мають склад:

1) Таукард (виробник ТОВ Астрафарм, Україна). Склад: таурин – 867,0 мг, екстракт трави кропиви собачої (пустирника) – 87,0 мг, екстракт плодів глоду – 43,0 мг. Допоміжні речовини: мікрокристалічна целюлоза, крохмаль прежелатинізований, повідон К30, Doshion P 544 DS, магнію стеарат, кремнію діоксид колоїдний; оболонка таблетки: гіпромелоза E15, PEG 6000, етилцелюлоза, тальк, барвники: диоксид титану (E171), оксид заліза червоний (E 172) [10].

2) Таурин Кардіо (виробник Biodeal Pharmaceuticals Private Limited, Індія). Склад: таурин - 867 мг, екстракт пустирника - 87 мг, екстракт глоду - 43 мг; допоміжні речовини: мікрокристалічна целюлоза, крохмаль прежелатинізований, повідон К30, кремнію діоксид колоїдний, магнію стеарат, гіпромелоза E15, ПЕГ400, титану діоксид, оксид заліза червоний, тальк [11].



Рис. 2. Зразки дієтичних добавок, що містять таурин.

2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Мірний посуд класу точності А (Додаток 1).
2. Водяна баня.
3. Ваги лабораторні Mettler Toledo XS204 (Додаток 2).
4. Спектрофотометр Jenway 6305 (Додаток 3).
5. рН-метр рН -150 MI (Додаток 4).

2.1.4. Реактиви.

1. Фармакопейний стандартний зразок ДФУ Таурин, каталожний номер Т0396, реєстраційний номер 107-35-7.
2. Вода очищена.
3. 2,4-динітрохлорбензен.
4. Спирт етиловий 96%.
5. Фосфатний буферний розчин з $\text{pH} = 9,18$

2.1.5. Приготування випробуваного розчину

Таблетку зразка подрібнюють, переносять у мірну колбу ємністю 1000 мл, додають дистильовану воду до розчинення зразка, доводять до мітки та старанно перемішують. При необхідності отриманий розчин фільтрують. Приготовлений розчин має концентрацію 0,867 мг/мл

2.1.6. Приготування 0,1%-го спиртового розчину 2,4-динітрохлорбензену.

На аналітичних терезах зважують 1 г 2,4-динітрохлорбензену, додають приблизно 20-25 мл спирту етилового 96% - го, інтенсивно струшують до розчинення кристалів, доводять спиртом до мітки та перемішують.

2.1.7. Приготування стандартного розчину таурину та серії стандартних розчинів таурину.

Для приготування стандартного розчину таурину на аналітичних терезах зважують 10 мг фармакопейного стандартного зразку ДФУ Таурин та переносять у мірну колбу ємністю 100 мл, додають дистильовану воду та струшують до розчинення таурину, доводять до мітки дистильованою водою та перемішують. Концентрація таурину в приготовленому розчині - 0,1 мг/мл.

З отриманого стандартного розчину готують серію розведених розчинів з концентраціями таурину 0,02мг- 0,20 мг:

Таблиця 1. Склад серії стандартних розчинів таурину.

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
С, мг	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20

2.2. Методика проведення спектрофотометричного визначення.

Відбирають 1 мл досліджуваного розчину, додають 1 мл 0,1% - го спиртового розчину 2,4-динітрохлорбензену та 1 мл фосфатного буферного розчину з РН = 9,18. Отриману суміш нагрівають на водяній бані з

температурою 90 °С протягом 30 хв, після чого додають 7 мл дистильованої води та перемішували. Вимірюють оптичну густину розчину при довжині хвилі 360 нм. Розчин порівняння – компенсаційний розчин, який не містить досліджувану речовину.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

3.1. Побудова спектру поглинання, визначення оптимальної довжини хвилі спектрофотометричного поглинання.

Для визначення довжини хвилі, при якій відбувається максимальне світлопоглинання сполуки таурину з 2,4-динітрохлорбенzenом, при якій будуть проводитись подальші визначення, використовували приготовлений стандартний розчин № 4 з концентрацією таурину 0,08 мг та вимірювали його оптичну густину в діапазоні довжин хвиль 300-500 нм. За максимумом на спектрі поглинання знайшли оптимальну довжину хвилі спектрофотометричного визначення λ . Результати вимірювань представлено у Таблиці 2 та Рис.3:

Таблиця 2. Побудова спектру поглинання

Довжина хвилі λ , нм	300	320	340	360	380	400	420	440	460	480	500
Оптична густина А	0,10	0,15	0,45	0,55	0,48	0,22	0,18	0,15	0,06	0,03	0,01

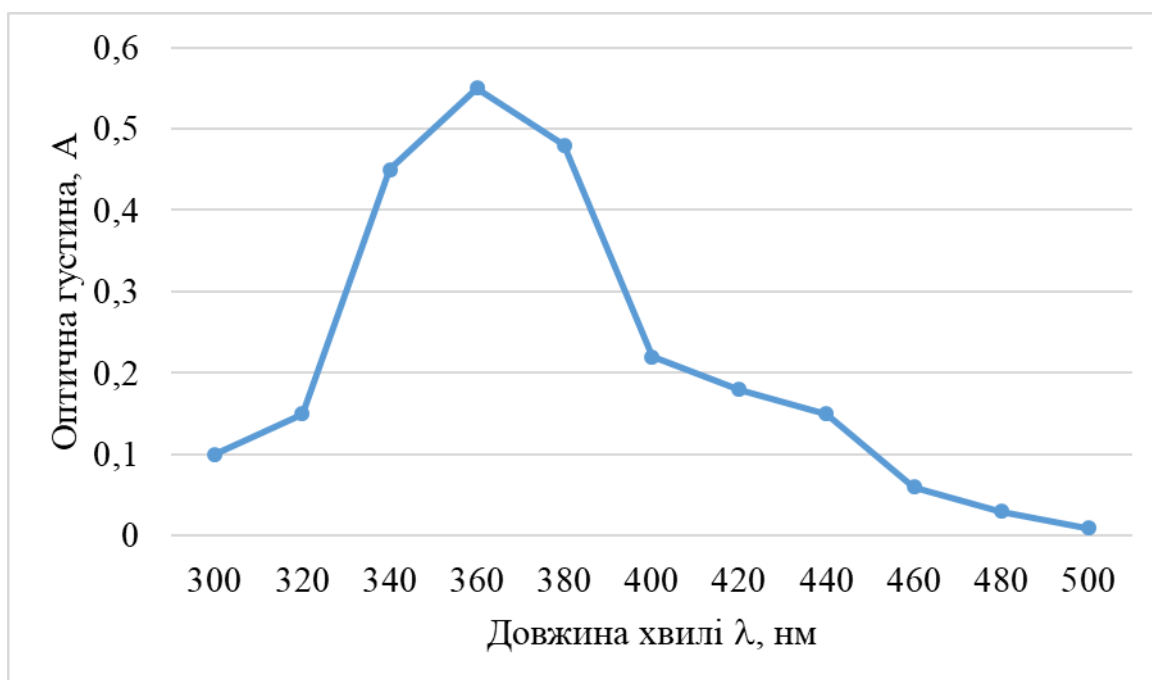


Рис.3. Спектр поглинання продукту взаємодії таурину з 2,4-динітрохлорбенzenом.

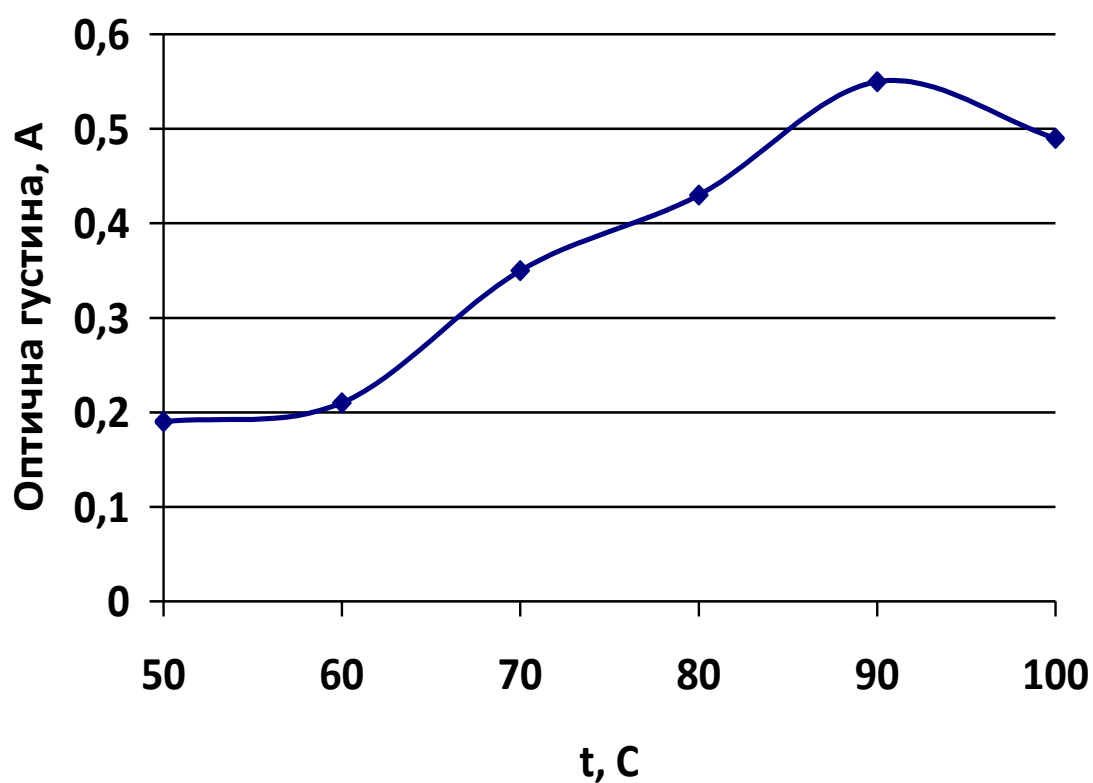
Отже, максимальне світлопоглинання спостерігається при довжині хвилі $\lambda_{\text{max}} = 360$ нм.

3.2. Вплив температури та часу нагрівання.

Для встановлення оптимальних умов спектрофотометричного визначення таурину досліджувалась залежність оптичної густини продукту взаємодії таурину з 2,4-динітрохлорбенzenом від температури та часу нагрівання реакційної суміші. Реакційну суміш 2,4-динітрохлорбензену з таурином нагрівали на водяній бані при температурі 50, 60, 70, 80, 90 та 100 °С протягом 10, 20, 30, 40 та 50 хвилин. Результати досліджень представлені на Рисунках 4 і 5 та в Таблицях 3 і 4.

Таблиця 3. Залежність оптичної густини від температури.

Температура $t, ^\circ\text{C}$	50	60	70	80	90	100
Оптична густина A	0,19	0,21	0,35	0,43	0,55	0,49

Рис 4. Залежність оптичної густини продукту взаємодії таурину з 2,4-динітрохлорбенzenом від температури ($\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ нм.}$).

Таблиця 4. Залежність оптичної густини від часу нагрівання

Час нагрівання, t, min	10	20	30	40	50
Оптична густина A	0,32	0,41	0,55	0,38	0,28

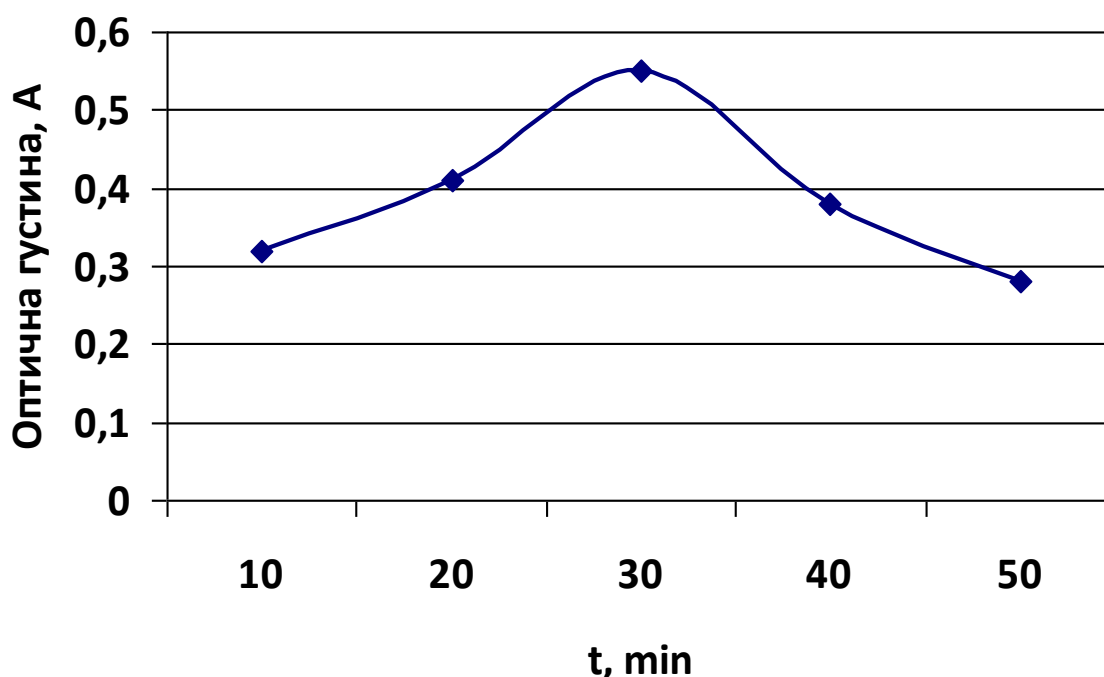


Рис 5. Залежність оптичної густини продукту взаємодії таурину з 2,4-динітрохлорбенzenом від часу ($\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ нм.}$).

З отриманих даних робим висновок, що оптимальні температура та час нагрівання реакційної суміші таурину з 2,4-динітрохлорбенzenом складають 90°C протягом 30 хв.

3.3. Побудова калібрувального графіка залежності оптичної густини A від концентрації таурину. Визначення лінійності залежності.

Для побудови градуювальної залежності оптичної густини A від концентрації таурину C проводили вимірювання величину оптичної густини A серії стандартних розчинів № 1-10 за методикою, яка описана у п. 2.2. За отриманими результатами вимірювань будували графічну залежність оптичної густини A від концентрації таурину в стандартних розчинах C. Результати вимірювань представлено у Таблиці 5 та на Рис. 6:

Таблиця 5. Залежність оптичної густини А від концентрації таурину С, мг.

№ розчину	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
С, мг	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Оптична густина, А	0,02	0,2	0,4	0,55	0,71	0,91	1,1	1,3	1,47	1,6

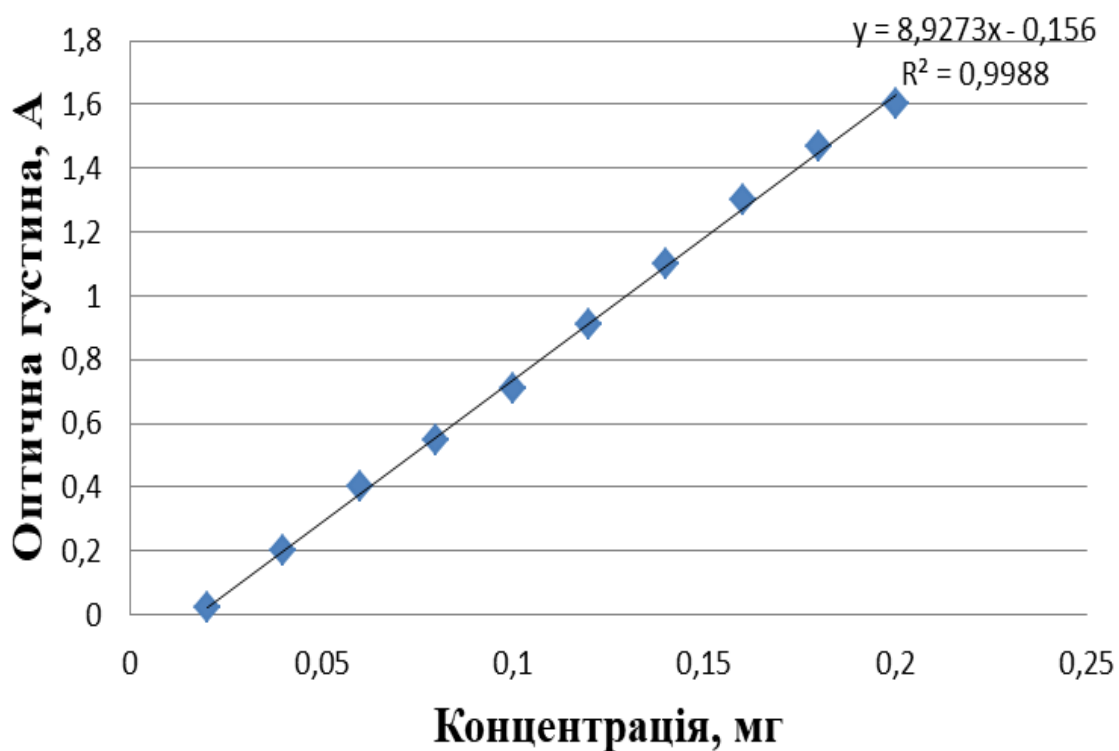


Рис 6. Калібрувальний графік - Залежність оптичної густини А від концентрації стандартних розчинів таурину С, мг.

Провели статистичну оцінку параметрів лінійної залежності, для чого за загальновідомими формулами розраховували величину залишкової дисперсії

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{v} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i^2 - a \cdot \sum_{i=1}^n y_i - b \cdot \sum_{i=1}^n x_i \cdot y_i}{v}, \quad v = n - 2.$$

$$s_0^2 = 0,000408$$

А також дисперсії констант a і b розраховували за рівняннями:

$$s_b^2 = \frac{n \cdot s_0^2}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2},$$

$$s_b^2 = 0.012369$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2.$$

$$s_a^2 = 0.00019$$

Щоб провести оцінку довірчих інтервалів констант, були розраховані стандартні відхилення s_b і s_a і також напівширини довірчих інтервалів Δ_b і Δ_a :

$$s_b = \sqrt{s_b^2},$$

$$s_b = 0,111217$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2},$$

$$s_a = 0,013802$$

$$\Delta_b = t(P, v) \cdot s_b, v = n - 2,$$

$$t(0.95; 8) = 2,3060$$

$$\Delta_b = 0,256466 \approx 0,2565$$

$$\Delta_a = t(P, v) \cdot s_a, v = n - 2.$$

$$\Delta_a = 0,031827 \approx 0,0318$$

Наступним кроком розраховували довірчі інтервали для констант a і b :

$$a \pm s_a \cdot t(P, v),$$

$$b \pm s_b \cdot t(P, v),$$

Лінійна регресія описується рівнянням: $y = 8,9273x - 0,156$ ($y = bx + a$)

Довірчий інтервал для коефіцієнта a : $0,156 \pm 0,0318$

Довірчий інтервал для коефіцієнта b : $8,9273 \pm 0,2565$

Коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,9998$.

Отже, дана методика відповідає критеріям лінійності в інтервалі концентрацій, які обрані для аналізу та в якому відбувається підпорядкування закону Бугера-Ламберта-Бера.

3.4. Кількісне визначення таурину у дієтичних добавках. Оцінка валідаційних характеристик.

Для забезпечення надійності і точності результатів, отриманих нами в дослідженні, потрібно провести валідацію розробленої методики кількісного визначення таурину в дієтичних добавках. [12,13]

3.4.1. Оцінка специфічності методики.

Враховуючи те, що методика кількісного визначення таурину була апробована на дієтичних добавках, які, крім таурину, містять більше п'яти допоміжних речовин і за результатами дослідження вміст діючої речовини відповідає заявленому в інструкції до медичного застосування, методику можна вважати специфічною.

Результати кількісного визначення таурину у досліджуваних зразках дієтичних добавок представлені у Таблицях 4 та 5.

3.4.2. Прецизійність та робасність.

Робасність методики оцінювали ще при її розробці, коли встановлювали оптимальні умови для протікання реакції між таурином та 2,4-динітрохлорбенzenом та визначали фактори, які можуть мати вплив на отримані значення оптичної густини розчинів. Також робасність оцінювали при аналізі досліджуваних зразків у різні дні, результати про що наведені в Таблицях 6 та 7.

Прецизійність методики – це близькість (або розбіжність) отриманих результатів, які були отримані за допомогою даної методики для серії визначень на різних пробах, але одного і того ж зразка [14]. Прецизійність обумовлюється випадковими похибками. Для нашої методики ми визначали прецизійність на рівні збіжності, для чого з трьох наважок готували три розчини, для кожного з яких проводили по три виміри оптичної густини та розраховували вміст таурину в досліджуваних зразках.

Таблиця 6. Результати кількісного визначення таурину у Зразку 1.

№ проби	Зразок 1, знайдено таурину у дієтичній добавці, враховуючи розведення, мг	
	День 1	День 2
1	864,56	865,98
2	871,06	870,08
3	866,71	868,63
4	869,13	867,73
5	868,35	366,74

Згідно інструкції до застосування Зразок 1 містить 867мг

Розраховували метрологічні характеристики збіжності розробленої методики (Зразок 1).

Розраховували середнє значення отриманих результатів за формулою

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n},$$

де n – обсяг вибірки.

$$\bar{x} \text{ (день 1)} = 867,96$$

$$\bar{x} \text{ (день 2)} = 867,83$$

Відносне стандартне відхилення RSD у відсотках, яке характеризує ступінь розкиду результатів по відношенню до середнього значення розраховуємо за формулою

$$RSD = s_r \cdot 100\%,$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}, \text{ де } s - \text{стандартне відхилення}$$

$$s \text{ (день 1)} = 2,462$$

$$s \text{ (день 2)} = 1,606$$

$$s_r \text{ (день 1)} = 0,00284$$

$$s_r \text{ (день 2)} = 0,00185$$

$$RSD \text{ (день 1)} = 0,284\%$$

$$RSD \text{ (день 2)} = 0,185\%$$

Розраховуємо дисперсію

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{v},$$

або

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{v},$$

де, $\bar{x}$ – середнє значення, x_i – всі значення вибірки, v – число ступенів свободи, n – обсяг вибірки.

$$s^2 \text{ (день 1)} = 6,063$$

$$s^2 \text{ (день 2)} = 2,581$$

Довірчий інтервал розраховуємо за формулою

$$\bar{x} \pm t_{p,v} \frac{s}{\sqrt{n}} = \bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}},$$

де $\bar{x}$ – середнє значення вибірки, s – стандартне відхилення, n – обсяг вибірки, $t_{p,v}$ – коефіцієнт Стюдента, $\Delta_{\bar{x}}$ – напівширина довірчого інтервалу; коефіцієнт Стюдента при $P=0,95$ та числі ступенів свободи $4 - 2,7764$

В нашому випадку за допомогою довірчого інтервалу ми можемо оцінити правильність отриманих результатів.

$$\Delta_{\bar{x}} (\text{день 1}) = 3,06$$

Довірчий інтервал приймає вигляд:

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = (867,96 \pm 3,06)$$

$$\Delta_{\bar{x}} (\text{день 2}) = 1,99$$

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = (867,83 \pm 1,99)$$

Отже, довірчий інтервал знаходиться в межах від 864,90 до 871,02. Дійсний вміст таурину становить 867 мг. Значення 867 мг входить у знайдений довірчий інтервал, отримані результати можна вважати правильними, використаний метод не містить систематичної помилки.

Відносну похибку середнього значення розраховуємо за формулою:

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

$$\bar{\varepsilon} (\text{день 1}) = 0,35\%$$

$$\bar{\varepsilon} (\text{день 2}) = 0,23\%$$

Таблиця 7. Результати кількісного визначення таурину у Зразку 2.

№ проби	Зразок 2, знайдено таурину у дістичній добавці, враховуючи розведення, мг	
	День 1	День 2
1	869,15	869,77
2	869,44	866,32
3	866,87	866,74
4	866,68	868,95
5	869,12	867,87

Згідно інструкції до застосування Зразок 2 містить 867мг.

Розраховували метрологічні характеристики збіжності розробленої методики (Зразок 2) як описано для Зразка 1. Отримали наступні результати:

- середнє значення отриманих результатів за формулою

$$\bar{x} \text{ (день 1)} = 868,25$$

$$\bar{x} \text{ (день 2)} = 867,93$$

- RSD – відносне стандартне відхилення у відсотках

$$s \text{ (день 1)} = 1,36$$

$$s \text{ (день 2)} = 1,45$$

$$s_r \text{ (день 1)} = 0,00156$$

$$s_r \text{ (день 2)} = 0,00167$$

$$RSD \text{ (день 1)} = 0,156\%$$

$$RSD \text{ (день 2)} = 0,167\%$$

- дисперсія

$$s^2 \text{ (день 1)} = 1,838$$

$$s^2 \text{ (день 2)} = 2,1092.$$

- довірчий інтервал

$$\Delta_{\bar{x}} \text{ (день 1)} = 2,28$$

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = (868,25 \pm 2,28)$$

$$\Delta_{\bar{x}} \text{ (день 2)} = 2,62$$

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = (867,93 \pm 2,62)$$

- відносна похибка середнього значення:

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

$$\bar{\varepsilon} \text{ (день 1)} = 0,26\%$$

$$\bar{\varepsilon} \text{ (день 2)} = 0,30\%$$

3.4.3. Правильність.

Правильність характеризує близькість середнього результату величини, що визначається, до істинного значення. У випадку нашого дослідження ми

порівнювали отримані результати спектрофотометричного визначення щодо кількісного вмісту таурину в досліджуваних зразках з його кількісним вмістом, зазначеним у інструкції до застосування. Крім того, після оцінки прецизійності, лінійності, робастності та специфічності, ми можемо зробити висновок про правильність методики спектрофотометричного визначення таурину в дієтичних добавках.

3.5. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення таурину.

Аналізуючи літературні джерела та маючи на увазі, що в ДФУ та Європейській фармакопеї відсутня стаття щодо таурину, можна стверджувати, що на сьогоднішній день відома не дуже велика кількість методів кількісного визначення таурину. Найчастіше в літературі зустрічається визначення таурину методом ВЕРХ, комбінованими методами РХ з передколонковою дериватизацією. Ці методи, звичайно, мають високу чутливість та селективність, але, мають недоліки - довготривала пробопідготовка та велика кількість реактивів. Визначення таурину спектрофотометричним методом є перспективним методом, оскільки він економічний, селективний, та має достатньо високій поріг чутливості.

ВИСНОВКИ

- Проведено аналіз літературних джерел щодо хімічних, та фармакологічних властивостей таурину, його роль для організму людини.
- На основі проведених досліджень була розроблена методика кількісного визначення таурину у дієтичних добавках Таукард та Таурин кардіо.
- Проведено часткову валідацію розробленої методики кількісного визначення таурину в дієтичних добавках спектрофотометричним методом аналізу за специфічністю, лінійністю, прецизійністю, робастністю та правильністю. Валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності згідно ДФУ, з чого слідує, що дану методику можна використовувати для кількісного визначення таурину в дієтичних добавках.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Електронний ресурс. Режим доступу: <https://belok.ua/blog/ua/taurine-polza-i-vred/>
2. Електронний ресурс. Режим доступу: <https://nutrix.ua/taurine/>
3. Електронний ресурс. Режим доступу: <https://umj.com.ua/uk/publikatsia-4749-kombinirovannyj-preparat-kratal-v-terapii-serdechno-sosudistyx-zabolevanij#list>
4. Електронний ресурс. Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D0%B0%D1%83%D1%80%D0%B8%D0%BD>
5. Коваленко Св. М. Дослідження деяких властивостей субстанцій таурину та тіоктової кислоти з метою створення комбінованого препарату для лікування діабетичних ускладнень. *Актуальні питання мед. науки та практики*. 2012., № 2 (9), С. 33-36.
6. Коваленко Св. М., Шкляєв С. А., Коваленко С. Н. Валідація ВЕРХ методики визначення таурину в комбінованому лікарському засобі для лікування діабетичних ускладнень. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2012., № 4 (24). С. 19-24.
7. Determination of free amino acids and taurine in *Sinonova culaconstricta* with 2, 4-dinitrochlorobenzene precolumn derivatization, Wang Yue Hong, International Conference on New Technology of Agricultural Engineering - ICAE, 2011
8. Електронний ресурс. Режим доступу: https://ozlib.com/878229/tehnika/spektrofotometricheskiy_analiz
9. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свєчнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001
10. Електронний ресурс. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%A2%D0%B0%D1%83%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B4/1051677/>

11. Електронний ресурс. Режим доступу:
<https://tabletki.ua/uk/%D0%A2%D0%B0%D1%83%D1%80%D0%B8%D0%BD-%D0%9A%D0%B0%D1%80%D0%B4%D0%B8%D0%BE/1030860/>
12. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : РІРЕГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.
13. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц, О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.
14. Електронний ресурс. Режим доступу:
https://www.slideshare.net/anna_chem/ss-47510120

ДОДАТКИ

Додаток 1.

Мірний посуд класу А.



Додаток 2.

Ваги лабораторні Mettler Toledo XS204, допустиме навантаження становить 220 г, дискретність – 0,1 мг.



Додаток 3.

Спектрофотометр Jenway 6305 (Велика Британія).



Діапазон довжин хвиль	від 198 до 1000 нм
Дозвіл довжини хвилі	1 нм
Точність довжини хвилі	± 2 нм
Спектральна смуга пропускання	8 нм, 6 нм в діапазоні УФ
Коефіцієнт пропускання	від 0 до 199,9%
Поглинання	-0,300 до 1,999A
Точність	$\pm 1\%$ T, $\pm 0,01$ Abs при 1000 поглинання
Роздільна здатність	0,1% T, 0,001A
Стабільність	1% / год після 20-хвилинного нагрівання
Діапазон концентрацій	-300 до 1999
Дозвіл концентрації	1 / 0,1
Одиниці вимірювання	мг/м ³ , мг/л, г/л, моль/л, ед.
Потужність	<50 Вт
Розмір (Ш x Д x В)	365 x 272 x 160 мм
Вага	6 кг

Додаток 4
рН-метр рН -150 МІ



Основні технічні характеристики:

Діапазон РН 1,00 – 14,00

Дискретність 0,01

Похибка перетворювача $\pm 0,02$

Похибка приладу $\pm 0,05$

Додаток 5.

Сертифікат учасника конференції.

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

СЕРТИФІКАТ № 2023-1101- 5508998-100109

ЦИМ ПОСВІДЧУЄТЬСЯ, ЩО

БАРТМАНСЬКА В.В.

БРАВ(ЛА) УЧАСТЬ У НАУКОВО-ПРАКТИЧНІЙ КОНФЕРЕНЦІЇ
З МІЖНАРОДНОЮ УЧАСТЮ, ПРИСВЯЧЕНІЙ 25-РІЧЧЮ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ФАКУЛЬТЕТУ

**ФАРМАЦЕВТИЧНА ОСВІТА, НАУКА ТА ПРАКТИКА:
СТАН, ПРОБЛЕМИ, ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ**

ГОЛОВА ОРГАНІЗАЦІЙНОГО КОМІТЕТУ,
РЕКТОР НАЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО
УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
ОСВІТИ НМУ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,
ЧЛЕН-КОРЕСПОНДЕНТ НАМН УКРАЇНИ,
Д.МЕД.Н., ПРОФЕСОР



ЮРІЙ КУЧИН

ЦІЛЬОВА АУДИТОРІЯ: АНАЛІТИЧНО-КОНТРОЛЬНА ФАРМАЦІЯ, ЗАГАЛЬНА ФАРМАЦІЯ, КЛІНІЧНА ФАРМАЦІЯ, ОРГАНІЗАЦІЯ І УПРАВЛІННЯ ФАРМАЦЕЮ, ОРГАНІЗАЦІЯ І
УПРАВЛІННЯ ОХОРОНОЮ ЗДОРОВ'Я, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОСМЕТОЛОГІЯ, ФАРМАЦЕВТИЧНА ТОКСИКОЛОГІЯ

19-20 грудня 2023 року

SUMMARY

Vlada Bartmanska

Topic: «Quantitative determination of taurine in dietary supplements by spectrophotometric method of analysis»

Department of analytical, physical and colloid chemistry

Scientific supervisor: Oksana Chkhalo

Keywords: taurine, dietary supplements, spectrophotometric method

Introduction. Taurine, a sulfur-containing amino acid, is synthesized in the body in fairly small amounts, but is consumed rapidly during physical activity and nervous tension, which leads to its deficiency. Taurine has a number of important functions in the human body. First of all, it has an antioxidant effect, regulates heart function, normalizes blood pressure, improves blood vessels, thereby reducing the risk of heart muscle diseases, increases mental activity, regulates blood glucose levels, stimulates reparative processes in dystrophic retinal disorders, improves metabolic processes in eye tissues, reduces the risk of developing cancer, participates in metabolic processes, and many others. Taurine is often used in cosmetics for its ability to improve skin tone and regeneration and its ability to relieve inflammation. After heavy physical exertion, taurine normalizes the circulatory system, reduces fatigue and increases endurance, so many rehabilitation specialists believe that it should be consumed regularly to help athletes recover quickly, increase their body's resistance to stress and maintain their health. Therefore, it is an urgent task to develop modern methods for the quantitative determination of taurine in dietary supplements.

The aim of the study is to develop a method for the quantitative determination of taurine in dietary supplements by spectrophotometric analysis.

Research methods. Spectrophotometric method of analysis.

Results. Various methods are known for the quantitative determination of taurine. One of them is the method of high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization with 2,4-dinitrochlorobenzene. The disadvantage of this method is the lengthy sample preparation and the large number of reagents

required. Another method is the spectrophotometric method using ninhydrin. The disadvantage of this method is the low selectivity of the method for combined drugs. The method of formyl titration with sodium hydroxide solution is also known, among the disadvantages of which is also the low selectivity of the method in the presence of other amino acids. For our study, we chose a spectrophotometric method for the quantitative determination of taurine using 2,4-dinitrochlorobenzene as a reagent. As a standard, we used the pharmacopoeial standard sample of DFU Taurine, the optical density was measured at a wavelength of 360 nm (determined by obtaining the absorption spectrum of the standard sample solution). The samples for the study were dietary supplements from a pharmacy chain that contain taurine. After appropriate sample preparation of each sample, the optical density of the resulting solutions was measured. The taurine content in the samples was determined according to the calibration chart. Analyzing the experimental data obtained, it was found that the validation characteristics meet the acceptance criteria according to the SPS, and therefore this method can be used for the quantitative determination of taurine in dietary supplements.

Conclusions. As a result of the study, a method for the quantitative determination of taurine in dietary supplements was developed and tested.