

Д.М. Юрченко, С.О. Васюк

РОЗРОБКА МЕТОДУ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ ЗА РЕАКЦІЮ З АЛОКСАНОМ

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: глюкозаміну гідрохлорид, алоксан, спектрофотометрія, кількісне визначення.

Ключевые слова: глюкозамин гидрохлорид, аллоксан, спектрофотометрия, количественное определение.

Key words: glucosamine hydrochloride, alloxan, spectrophotometry, quantitative determination.

Запропоновано спектрофотометричний спосіб кількісного визначення глюкозаміну гідрохлориду в субстанції та лікарських формах, в основі якого лежить реакція взаємодії досліджуваної речовини з алоксаном. Спосіб характеризується чутливістю, простотою у виконанні.

Предложен спектрофотометрический метод количественного определения глюкозамина гидрохлорида в субстанции и лекарственных формах, в основе которого лежит реакция взаимодействия исследуемого вещества с аллоксаном. Способ характеризуется чувствительностью, простотой в выполнении.

The method of quantitative spectrophotometric identification of glucosamine hydrochloride in substances and in dosage form is worked out. This method is based on the reaction of interaction of a preparation with alloxan. The method is characterized by high sensitiveness and it is easy executable.

Глюкозаміну гідрохлорид широко застосовується для лікування дегенеративно-дистрофічних захворювань опорно-рухового апарату. Згідно проаналізованих літературних даних вміст препарату найчастіше визначають високоефективною рідинною хроматографією [7]. Визначення проводять за індексом заломлення після розділення за допомогою спеціального детектора. Метод є демонстративним, лінійним, чутливим, точним та достовірним, але має наступні недоліки – потребує розділення та спеціальної колонки для цього визначення. Описаний метод рідинної хроматографії за реакцією з фенілізотіоціонатом [12]. Враховуючи те, що глюкозаміну гідрохлорид мало поглинає світло в УФ-області, проводять реакцію з зазначеним реагентом для отримання похідного, що буде поглинати світло у цій ділянці спектра. Метод вимагає багато часу на виконання, до того ж реагент є канцерогеном. Відомим є також метод кількісного визначення глюкозаміну гідрохлориду за допомогою високоефективної рідинної хроматографії, спектрометрії та мас-спектрометрії [4]. Також описано сумісний метод ВЕРХ з мас-спектрометрією [13] у людській плазмі, метод рідинної хроматографії з іонізацією та наступним визначенням мас-спектрометрією [9]. Рухома фаза – 0,1% розчин мурашиної кислоти. Використовують зворотньо-фазну колонку з оптимально підібраними умовами визначення. Зазначені методи є чутливими, досить точними, надійними, але не є доступними та простими у виконанні. Описаний метод високоефективної аніон-обмінної хроматографії з електролітичним елюванням [8]. Відома методика визначення глюкозаміну за допомогою капілярного електрофорезу з використанням мікрочипу [10], визначення проводять при значеннях рН 8,99, 9,51 та 10,01; УФ – та флуоресцентної спектроскопії [11]. Методи потребують спеціального обладнання та навичок. Запропоновано метод визначення за допомогою газової хроматографії [6]. Розчинниками виступають ацетилат та ангідрид оцтової кислоти в піридині. Описано методику

газо-рідинної хроматографії [5]. Два еквіваленти піридину додають до кислого метанолу, що вміщує аміноцукор, відбувається нейтральний або кислотний каталіз з наступною реакцією з N-ацетилатом в середовищі оцтового ангідриду. N-ацетилат кількісно витримують 10 хв. в умовах кімнатної температури. Зайвий оцтовий ангідрид видаляють сольволизом метанолом. Далі використовують іон-обмінну колонку, нерозчинна сіль таким чином обходить її, а продукти випаровуються. Таким чином, відомі методи визначення глюкозаміну гідрохлориду потребують часто дорогого обладнання і, тому, не є досить доступними.

МЕТА РОБОТИ – вивчення умов перебігу реакції глюкозаміну гідрохлориду з алоксаном та розробка на цій основі методу кількісного визначення в лікарських формах.

У роботі використовували наступні реагенти та розчинники, що відповідали вимогам АНД: алоксан кваліфікації хч, воду дистильовану (Державна Фармакопея України, 1095504), диметилформамід (Державна Фармакопея України, 1030300), розчин кальцію хлориду (Державна Фармакопея України, 1014601) [3].

Експериментально нами було встановлено, що глюкозаміну гідрохлорид реагує з алоксаном при нагріванні на водяній бані протягом 10 хв. у водно-диметилформамідному середовищі. Нагрівання впродовж більшого чи меншого відрізка часу не було раціональним та дуже впливало на значення оптичної густини. Продукт реакції забарвлювався в рожево-фіолетовий колір та мав максимум поглинання при довжині хвилі 520 нм. Після охолодження реакційної суміші до кімнатної температури для підвищення чутливості реакції додавали 1% розчин кальцію хлориду. Як змінювався спектр поглинання продемонстровано на *рис. 1*. При цьому відбувається взаємодія мурексиду з катіоном кальцію, утворюється комплекс, змінюється електронна структура хромофора. Таким чином, продукт реакції міняє свій колір на оранжевий та відбувається гіпсохромний зсув до макси-

муму поглинання 481 нм. Встановлено, що при додаванні катіонів кадмію та кобальту отримуємо продукти з меншою спектральною поглинальною здатністю (рис. 2).

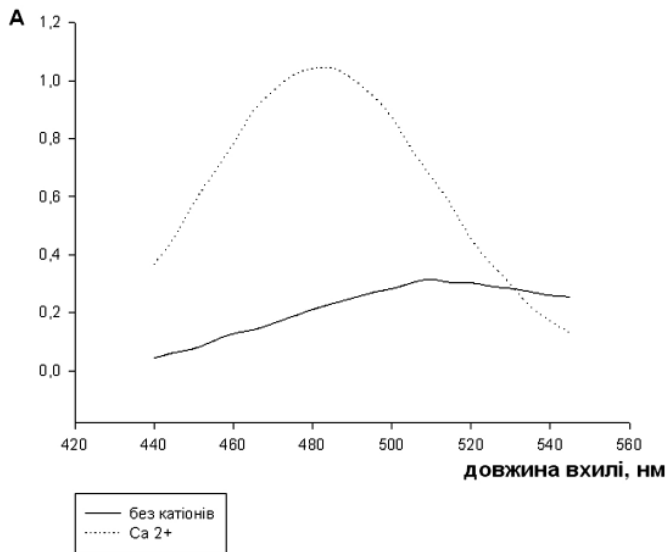


Рис. 1. Спектр поглинання продукту реакції без додавання катіонів та при додаванні розчину кальцію хлориду.

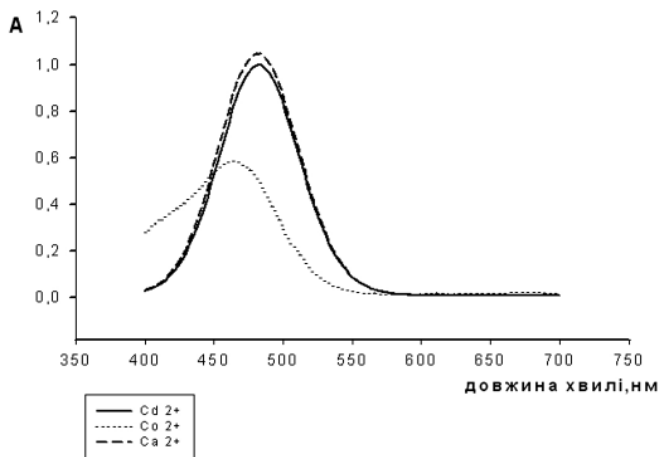


Рис. 2. Спектри поглинання продукту реакції з додаванням катіонів.

Відривальний мінімум, розрахований за загальновідомою методикою [1], становив 2,171 мг/мл.

Підпорядкування закону світлопоглинання перебуває в межах концентрації глюкозаміну гідрохлориду 2,56 – 6,40 мг/100мл.

Розрахунок відсоткового вмісту препарату для субстанції та в грамах в лікарській формі проводили методом стандарту, використовуючи субстанцію глюкозаміну, що відповідає вимогам Фармакопеї США.

Методика кількісного визначення глюкозаміну гідрохлориду в субстанції. Точну наважку в межах 0,0125 – 0,0435 г. вміщували у мірну колбу ємністю 25,00 мл., додавали 2,50 мл. води дистильованої, розчиняли, доводили до позначки ДМФА, ретельно перемішували. 1,00 мл. одержаного розчину поміщали у мірну колбу ємністю 25,00 мл., додавали 2,00 мл. свіжовиготовленого 5% розчину алоксану

та нагрівали на водяній бані протягом 10 хв. Знімали з бані та охолоджували до кімнатної температури, після цього додавали 0,50 мл. 1 % розчину кальцію хлориду. Доводили до позначки диметилформамідом, ретельно перемішували та визначали оптичну густину. Паралельно проводили пробу з 1,00 мл. стандартного розчину (0,128 г. в 100 мл.) глюкозаміну гідрохлориду і компенсаційним розчином, що не містив визначуваної речовини.

Оптичну густину досліджуваного і стандартного розчинів визначали на приладі Specord 200 при довжині хвилі 481 нм у кюветі з товщиною оптичного шару 1 см.

Розрахунок відсоткового вмісту проводили за формулою:

$$X = \frac{A \cdot C_0 \cdot 25 \cdot 25}{A_0 \cdot a \cdot l}$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 – оптична густина стандартного розчину;

C_0 – концентрація стандартного фотометричного розчину (0,00512 г в 100 мл);

a – наважка, г;

l – товщина шару, см.

Результати кількісного визначення наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Результати кількісного визначення глюкозаміну гідрохлориду (n = 6, p = 95 %)

Досліджуваний об'єкт	Наважка, г	Знайдено, %, г	Метрологічні показники
Субстанція глюкозаміну гідрохлориду	0,0176	85,2	$\bar{x} = 85,425$
	0,0246	85,1	$S^2 = 4,00575$
	0,0326	89,4	$S = 2,00143$
	0,0350	84,6	$S_{\bar{x}} = 0,820$
	0,0352	84,2	$\Delta\bar{x} = 2,109$
Таблетки «Артрон триактив» Серія AA023A Виробник UNIPHARM, INC, USA	0,0790	0,471	$\bar{x} = 0,488$
	0,0826	0,498	$S^2 = 0,00861$
	0,0965	0,519	$S = 0,0293$
	0,0985	0,519	$S_{\bar{x}} = 0,120$
	0,1146	0,505	$\Delta\bar{x} = 0,0308$
	0,1231	0,496	

Методика кількісного визначення глюкозаміну гідрохлориду в таблетках «Артрон триактив». Точну наважку таблеток розчиняють в 2,50 мл води очищеної у мірній колбі на 25,00 мл, змивають залишки в бюксі ДМФА та доводять до позначки диметилформамідом, ретельно перемішують. Одержаний розчин фільтрують, перші порції фільтрату відкидають, а із наступних беруть 1,00 мл та далі проводять визначення так само, як вказано у «Методиці кількісного визначення глюкозаміну гідрохлориду в субстанції», починаючи зі слів: «додають 2,00 мл свіжовиготовленого...». Визначення вмісту глюкозаміну гідрохлориду проводять за формулою:

$$X = \frac{A \cdot C_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot l \cdot 100}$$

де P – середня маса таблетки, г

Результати кількісного визначення глюкозаміну



гідрохлориду у таблетках «Артрон триактив» наведено в табл. 1.

При визначенні деяких валідаційних характеристик методики користувались рекомендаціями [2].

Розроблена методика є специфічною, бо визначенню діючої речовини не заважають допоміжні речовини, що входять до складу лікарської форми.

Для оцінки лінійності розробленої методики будували графік залежності оптичної густини від наважок досліджуваної субстанції, що представлено на рис. 3.

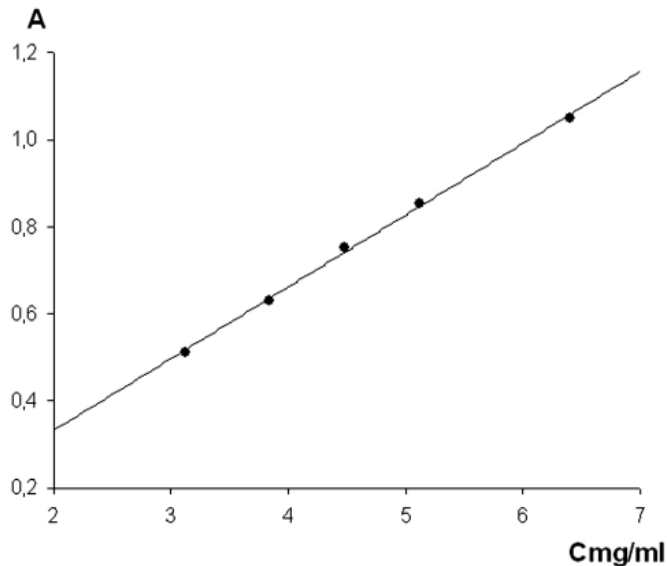


Рис. 3. Графік залежності оптичної густини від наважок субстанції глюкозаміну гідрохлориду.

Як видно з нього, оптична густина лінійно збільшується зі збільшенням концентрації глюкозаміну гідрохлориду. Одержана залежність описується рівнянням: $y = 0,0012x + 0,1650x$, коефіцієнт кореляції $r = 0,99911$, стандартне відхилення $S_x^- = 0,0100$.

Проведено визначення ще однієї валідаційної характеристики – збіжності. Для цього брали три наважки таблеток «Артрон триактив», з яких аналізували по три аліквоти. За отриманими результатами проведено статистичну обробку (табл. 2).

Таким чином, за визначеними параметрами методика є валідною.

Таблиця 2

Визначення збіжності для таблеток «Артрон триактив»

Наважка, г	Метрологічні показники				
	x^-	S^2	S	S_x^-	Δx^-
0,476-0,523	0,505	0,000271	0,0164	0,0325	0,0126

Відомості про авторів:

Юрченко Дар'я Миколаївна, старший лаборант кафедри біологічної хімії та лабораторної діагностики, ЗДМУ.

Васюк Світлана Олександрівна, професор кафедри аналітичної хімії ЗДМУ.

Адреса для листування: Васюк Світлана Олександрівна, 69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26, ЗДМУ, кафедра аналітичної хімії. Тел.р. : (0612) 34-21-81, 098-250-32-63

ВИСНОВКИ

1. Встановлено оптимальні умови перебігу реакції глюкозаміну гідрохлориду з алоксаном.

2. Запропоновано спектрофотометричний метод кількісного визначення глюкозаміну гідрохлориду за досліджуваною реакцією.

3. Розроблено методику кількісного визначення глюкозаміну гідрохлориду у готових лікарських формах.

4. Визначено деякі валідаційні характеристики, а саме: лінійність, збіжність.

5. Запропоновано методику, що характеризується чутливістю, простотою у виконанні та може бути використана у роботі Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. / Булатов М.И., Калинин И.П. – 5-е изд. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
2. Гризодуб А.И. Валідация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. – 2002. - №3. – С.42-50.
3. Державна Фармакопея України. – 1-ше вид.- Харків: PIPEГ, 2001. –С.187, 195, 215.
4. A novel HPLC–UV–MS method for quantitative analysis of protein / Anton S. Karnoup, Krishna Kuppanana and Scott A. Younga // Journal of Chromatography B.- 2007. – 859, №2, 15. - P.178-191.
5. A procedure for the rapid, quantitative N-acetylation of amino sugar methyl glycosides / James R. Etchison and John J. Holland // Analytical Biochemistry.- 1975. – 66, №1.-P.87-92.
6. Gas chromatography of neutral and amino sugars in glycoproteins / William Niedermeier // Analytical Biochemistry. - 1971. - 40, №2. - P.465-475.
7. Determination of glucosamine and lactose in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography / Wang Xinmina, Zhang Ruilia, Lv Zhihuaa etc. // Journal of Food Composition and Analysis. - 2007. – 21, №3. - P.255-258.
8. High-performance anion-exchange chromatography using on-line electrolytic eluent generation for the determination of more than 25 intermediates from energy metabolism of mammalian cells in culture / Joachim B. Rittera, Yvonne Genzela and Udo Reichla // Journal of Chromatography B.- 2006. – 843, №2. - P.216-226.
9. Improved and simplified liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized glucosamine in human plasma / Sheng Zhonga, Dafang Zhonga and Xiaoyan Chena // Journal of Chromatography B.-2007.- 854, №1-2.- P.291-298.
10. Rapid on-column analysis of glucosamine and its mutarotation by microchip capillary electrophoresis / Alison M. Skelleya and Richard A. Mathies // Journal of Chromatography A. – 2006.- 1132, №1-2.-P.304-309.
11. The effect of nonenzymatic glycation on the stability and conformation of two deoxyoligonucleotide duplexes: A spectroscopic analysis by circular dichroism / Udayan Duttaa, Menashi A. Cohenforde and Joel A. Dainb // Analytical Biochemistry. – 2007.- 360, №2.- P.235-243.
12. The United States Pharmacopeial Convention. – 2001. -25, №5. – P.1625.
13. Ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of epirubicin in human plasma / Ruiping Lia, Lili Donga and Junxiong Huanga // Analytica Chimica Acta. – 2005. - 546, №2.-P.167-173.