



К.П. Портна, С.О. Васюк

Кількісне визначення глюкозаміну в лікарських формах спектрофотометричним методом

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова:

спектрофотометрія, глюкозамін,
натрієва сіль
1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти,
кількісне визначення.

Розроблено нову спектрофотометричну методику кількісного визначення глюкозаміну в лікарських формах, що ґрунтується на вимірюванні абсорбції водних розчинів глюкозаміну при 510 нм. Методика відповідає вимогам ДФУ за такими валідаційними характеристиками, як специфічність, лінійність, прецизійність, правильність і робастність.

Количественное определение глюкозамина в лекарственных формах спектрофотометрическим методом

Е.П. Портная, С.А. Васюк

Разработана новая спектрофотометрическая методика количественного определения глюкозамина в лекарственных формах, основанная на измерении абсорбции водных растворов глюкозамина при 510 нм. Методика отвечает требованиям ГФУ по таким валідаційним характеристикам, как специфичность, линейность, точность, правильность и робастность.

Ключевые слова: спектрофотометрия, глюкозамин, натриевая соль 1,2-нафтохинон-4-сульфоїкислоты, количественное определение.

Quantitative determination of glucosamine in pharmaceutical formulations by spectrophotometric method

K.P. Portna, S.O. Vasyuk

A new spectrophotometric method for the quantitative determination of glucosamine in pharmaceutical formulations is developed. This method is based on measurement of aqueous glucosamine solutions absorption at 510 nm. The proposed method is valid according to the validation requirements of Ukrainian Pharmacopeia.

Key words: spectrophotometry, glucosamine, 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid sodium salt, quantitative determination.

На сучасному етапі розвитку фармацевтичної науки та практики ринок лікарських препаратів невинно розширюється. Зважаючи на те, що препарати глюкозаміну на фармацевтичному ринку України з'явилися відносно недавно, забезпечення контролю якості лікарських форм, що містять глюкозамін, є актуальною проблемою сучасності.

Дані наукової літератури свідчать про використання радіометрії [1], потенціометрії [2], ВЕРХ [3–5] для кількісного визначення глюкозаміну. Є відомості відносно спектрофотометрії глюкозаміну як в УФ-області, так і у видимій ділянці спектру [6]. При детальному розгляді зазначених методик стає очевидним, що в більшості випадків їх значними недоліками є тривалість процедури пробопідготовки або процедури аналізу, невисока чутливість і селективність визначення або висока вартість обладнання та його недоступність для регіональних лабораторій з контролю якості. Тому розробка нових, точних і експресних методів кількісного визначення цієї речовини у складі лікарських форм є безпосередньою необхідністю на етапі забезпечення належного контролю якості ліків.

Мета роботи

Розробка та валідація зручної, економічної, чутливої методики кількісного визначення глюкозаміну в лікарських формах за реакцією з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти та встановлення стехіометричних співвідношень компонентів реакційної суміші глюкозамін – реагент.

Матеріали і методи дослідження

Для здійснення дослідження використано РСЗ глюкозаміну гідрохлориду (серія ЕС № 2000-638-1); лікар-

ські засоби: порошок для приготування розчину для перорального застосування у пакетиках «Артифлекс» 4,0/1,5 г глюкозаміну сульфату (Фармацевтична фабрика «Здоров'я», м. Харків, Україна), капсули «Терафлекс» 0,5 г глюкозаміну гідрохлориду (BayerHealthCare, США), таблетки «Хондромакс гербал» MAXHEALTH 0,5 г глюкозаміну гідрохлориду («Фармекс», Україна), серії 70511, 111016 та 0980511 відповідно.

У якості реактивів і розчинника використовували натрієву сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти кваліфікації хч, 0,01 М розчин NaOH, воду очищену.

Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200, ваги електронні АВТ-120-5DM, водяна баня Memmert WNB 7-45, мірний посуд класу А.

Загальна методика кількісного визначення глюкозаміну гідрохлориду

Аліквотну частину (0,0015 г) водного розчину глюкозаміну вміщують у мірну колбу місткістю 25,00 мл, обробляють 2,00 мл 0,5% водного розчину натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти, 3,00 мл 0,01 М розчину NaOH, перемішують. Отриманий розчин нагрівають 3 хв на водяній бані при температурі 65°C, охолоджують і доводять очищеною водою до позначки. Абсорбцію досліджуваного розчину вимірюють на фоні компенсацийного розчину, що не містить досліджуваної речовини, при 510 нм.

Визначення глюкозаміну в лікарських формах

При визначенні глюкозаміну в капсулах «Терафлекс» і таблетках «Хондромакс гербал» точну наважку капсульної (0,0580–0,0968 г) або таблеткової маси (0,0864–0,144 г) вміщують у мірну колбу місткістю 25,00 мл, доводять водою до позначки, отриманий розчин фільтрують. 1,00 мл

отриманого розчину вміщують у мірну колбу місткістю 25,00 мл, додають необхідну кількість реагенту, розчину NaOH, перемішують. Отриману реакційну суміш нагрівають на водяній бані, охолоджують і доводять очищеною водою до позначки. При визначенні глюкозаміну в пакетиках «Артифлекс» весь вміст саше (1,5 г/4,0 г) переносять у мірну колбу на 100,0 мл, доводять очищеною водою до позначки, перемішують. Отриманий розчин (5,00 мл) вміщують у мірну колбу місткістю 50,00 мл, доводять водою до позначки й надалі аналізують за загальною методикою кількісного визначення. Паралельно проводять дослід з розчином порівняння.

Абсорбцію досліджуваного розчину та розчину порівняння вимірюють на фоні компенсаційного розчину, що не містить досліджуваної речовини, за довжини хвилі 510 нм. Розрахунок кількісного вмісту глюкозаміну в лікарських формах проводять за типовою формулою. У випадку лікарських форм, де до складу входить глюкозаміну сульфат, а в розчин порівняння – глюкозаміну гідрохлорид, в формулу додається коефіцієнт перерахунку з урахуванням молекулярних мас.

Результати та їх обговорення

Для розробки методик кількісного визначення глюкозаміну на основі реакції з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти вивчали фактори, що впливають на характер спектру поглинання та повноту утворення продуктів реакції (за величиною оптичної густини), зокрема природу розчинника, кількість реагента, рН реакційної суміші, час і температуру нагрівання, стійкість продуктів реакції в часі.

Експериментально встановлено, що реагент взаємодіє

з глюкозаміном у водному середовищі з утворенням забарвленої сполуки з максимумом світлопоглинання при 510 нм. При цьому оптимальна кількість 0,5% реагента, необхідна для утворення продукту реакції з максимальною оптичною густиною, складає 2,00 мл (рис. 1).

Експериментально встановлено, що обов'язковими умовами успішного перебігу реакції між реагентом і лікарською речовиною є створення лужного середовища та нагрівання на водяній бані. Оптимальну кількість 0,01 М розчину NaOH (рис. 2), час (3 хв) та температуру нагрівання (рис. 2) встановлено експериментально за максимальною оптичною густиною.

Як видно на рис. 1 (II), величина оптичної густини продуктів реакції глюкозаміну гідрохлориду з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти стабільна протягом щонайменше 30 хв.

Отже, інтенсивність забарвлення продуктів реакції натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти з глюкозаміном залежить від природи розчинника, об'єму реагента, рН реакційної суміші, температури та часу нагрівання.

Значення молярного коефіцієнта абсорбції ($1,13 \cdot 10^3$) та межа виявлення (9,53 мкг/мл) свідчать про достатню високу чутливість реакції.

Експериментально встановлені оптимальні умови перебігу реакції глюкозаміну з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти покладено в основу розробки спектрофотометричних методик кількісного визначення глюкозаміну в складі лікарських препаратів.

Встановлення стехіометричних співвідношень компонентів реакційної суміші глюкозамін – натрієва сіль

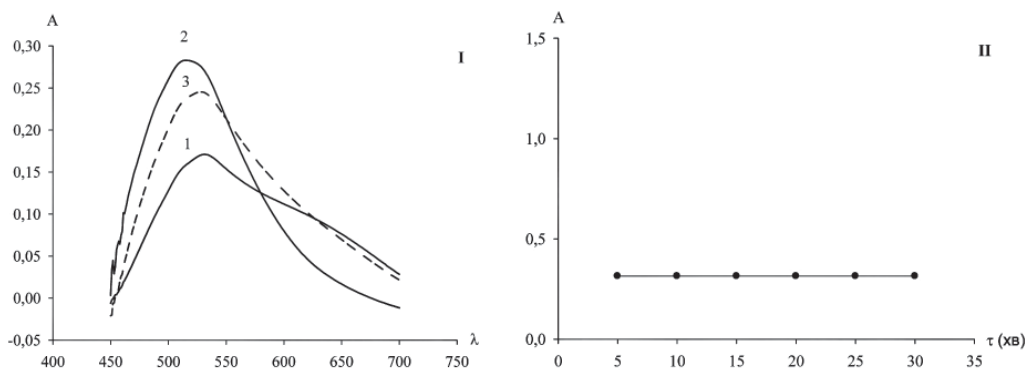


Рис. 1. Спектри поглинання продукту реакції глюкозаміну з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти.

Примітки: 1 – 1,00 мл реагента; 2 – 2,00 мл; 3 – 3,00 мл (I); графік залежності оптичної густини продуктів реакції глюкозаміну гідрохлориду з реагентом від часу (II).

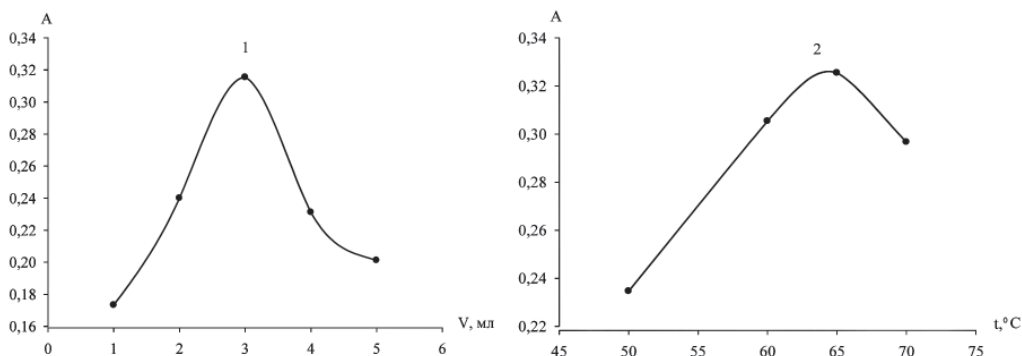


Рис. 2. Графіки залежності оптичної густини продуктів реакції глюкозаміну гідрохлориду з реагентом від кількості 0,01 М розчину NaOH (1) та від температури нагрівання на водяній бані протягом 3 хв (2).

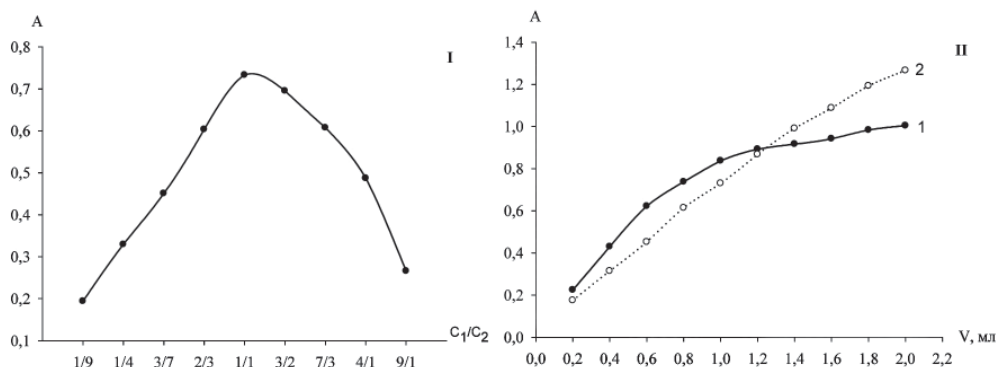


Рис. 3. Графік залежності величини оптичної густини від складу ізомолярного розчину.

Примітки: C_1 – 0,02 М розчин глюкозаміну, C_2 – 0,02 М розчин натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти (I); криві насичення: 1 – глюкозаміну при постійній концентрації розчину реагента (1,00 мл 0,02 М розчину); 2 – реагента при постійній концентрації розчину глюкозаміну (1,00 мл 0,02 М розчину) (II).

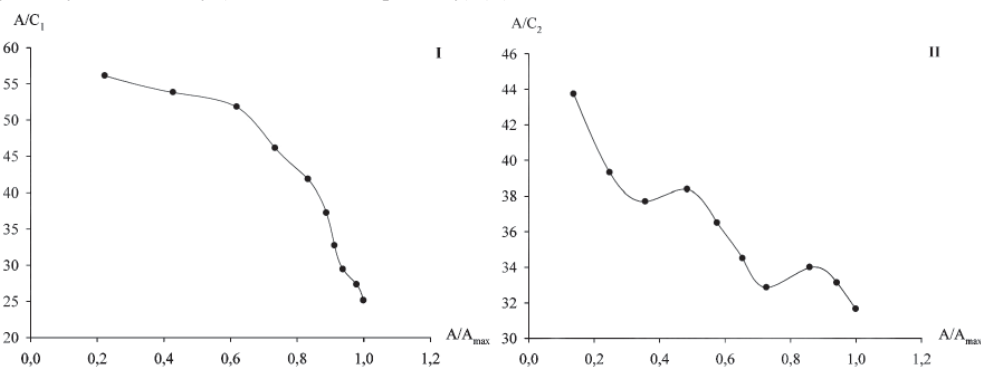


Рис. 4. Криві відносного виходу за реакцією натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти з глюкозаміну гідрохлоридом при постійній концентрації натрієвої солі реагенту (I); при постійній концентрації глюкозаміну гідрохлориду (II).

1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти.

Для цього використано найпоширеніші методи, зокрема метод неперервних змін (ізомолярних серій), метод насичення (молярних співвідношень) і метод відносного виходу (Старіка-Барбанеля) [7].

Метод неперервних змін ґрунтується на визначенні співвідношень ізомолярних концентрацій речовин, які реагують, що відповідає максимальному виходу утворених у результаті сполук. При цьому крива залежності виходу продукту реакції від складу розчину характеризується екстремальною точкою, положення якої пов'язане зі стехіометричними коефіцієнтами m і n продукту реакції $M_m R_n$ (рис. 3).

Сутність методу молярних співвідношень полягає у встановленні залежності величини оптичної густини від концентрації одного з компонентів при постійній концентрації другого компонента і навпаки. Співвідношення встановлюють за допомогою перпендикулярної прямої, опущеної з перетину двох кривих (рис. 3).

Отримані залежності величини оптичної густини від концентрації одного з компонентів при постійній концентрації другого компонента використано для встановлення стехіометричних коефіцієнтів методом відносного виходу. Метод ґрунтується на використанні рівняння алгебраїчної суми стехіометричних коефіцієнтів реакції, що характеризують склад рівноважної суміші в точці максимального відносного виходу. Дослід проводять аналітичним методом у поєднанні з графічним будівництвом кривих відносного виходу у координатах $A/$

$C_1 - A/A_{max}$ у випадку $C_2 - const$ та у випадку $C_1 - const$ у координатах $A/C_2 - A/A_{max}$. Відсутність максимуму на кривій відносного виходу вказує, що стехіометричний коефіцієнт компонента змінної концентрації дорівнює одиниці (рис. 4).

Стехіометричні співвідношення компонентів «натрієва сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти – глюкозамін», отримані методами неперервних змін, насичення та відносного виходу, однозначно збігаються і становлять 1:1.

Визначення основних валідаційних характеристик

Лінійну залежність оптичної густини від концентрації глюкозаміну спостерігають у межах 4,80–8,00 мг/100 мл. Основні параметри лінійної залежності наведено в таблиці 1.

Розроблену методику апробовано на 3 лікарських формах. Прецизійність методики визначали на рівні збіжності відповідно до вимог ДФУ [8]. Дані підтверджують, що значення довірчого інтервалу ($\Delta_{x,r}$) менше максимально допустимої невизначеності аналізу (Δ_{As} %), тому методика може вважатись точною на рівні збіжності (табл. 2).

Згідно з ДФУ, правильність результатів встановлювали методом добавок. Методика є правильною, оскільки виконується умова $|\bar{Z} - 100| \leq \Delta_2$, систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, тобто справжнє значення величини, що визначається, знаходиться в межах свого довірчого інтервалу [8]. Отримані дані наведено у таблиці 3.

Оцінку робастності виконано на стадії розробки мето-

Таблиця 1

Кількісні показники лінійної залежності			
Величина	Значення	Критерії	Висновок
Глюкозаміну гідрохлорид			
$b \pm (s_b)$	0,0383±(0,0007)	–	–
$a \pm (s_a)$	0,0048±(0,0029)	$ a \leq \Delta a = t(95\%;3) \cdot s_a = 0,00682$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	0,775	$\leq \Delta_{As}(\%) / t(95\%;3) = 1,360$	відповідає
r	0,9994	$\geq 0,9976$	відповідає

Таблиця 2

Визначення збіжності результатів кількісного визначення глюкозаміну в готових лікарських формах (n=9, p=0,95)

Лікарський препарат	Метрологічні характеристики					
	\bar{X}	S	RSD	$\Delta_{x,r}$	$\Delta_{x,r}$	$\Delta_{As}\%$
Порошок у пакетиках «Артифлекс»: глюкозаміну 1,5 г/4,0 г	1,49	$9,39 \cdot 10^{-3}$	0,627	1,167	0,389	2,40
Капсули «Терафлекс»: глюкозаміну 0,50 г	0,499	$6,97 \cdot 10^{-3}$	1,39	2,59	0,866	3,20
Таблетки «Хондромакс гербал»: глюкозаміну 0,50 г	0,496	$2,59 \cdot 10^{-3}$	0,522	0,971	0,324	3,20

Таблиця 3

Результати визначення правильності методом добавок

Лікарський препарат	Взято, мг/100 мл	Добавка, мг/100 мл	Z'	$\bar{Z} \pm \Delta_z$	$ \bar{Z} - 100 $
Порошок у пакетиках «Артифлекс»: глюкозаміну 1,5 г/4,0 г	4,80	0,600	101,0	100,3±0,884	0,278
	4,80	1,20	98,72		
	4,80	1,80	101,1		
Капсули «Терафлекс»: глюкозаміну 0,50 г	4,80	0,600	99,96	99,93±0,395	0,007
	4,80	1,20	100,5		
	4,80	1,80	99,33		
Таблетки «Хондромакс гербал»: глюкозаміну 0,50 г	4,80	0,600	99,66	99,83±0,639	0,170
	4,80	1,20	100,0		
	4,80	1,80	99,83		

дики. Визначали стабільність аналітичних розчинів у часі та вплив кількості доданих реагентів на результати визначення. Встановлено, що досліджувані забарвлені розчини стійкі не менше 30 хв, а коливання кількості доданого реагента (розчину натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти) у межах $\pm 10\%$ не впливають на величину оптичної густини [8].

Висновки

Розроблено чутливу, економічну, селективну спек-

трофотометричну методику кількісного визначення глюкозаміну в субстанції та лікарських формах. Трьома методами встановлено стехіометричні співвідношення компонентів реакційної суміші «глюкозамін – натрієва сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти», що становлять 1:1. Доведено, що розроблена методика кількісного визначення за такими характеристиками, як лінійність, прецизійність, правильність і робастність є валідною, відзначається простотою виконання, є доступною і може бути застосована у контролі якості лікарських засобів.

Список літератури

- Bradley D.C. Radiometric assays for glycerol, glucosamine and glycogen / Bradley D.C., Kaslow H.R. // Anal. Biochem. – 1989. – Vol. 180, №1. – P. 11–16.
- Davydova S.L. Application of copper-selective electrodes in the determination and investigation of monomeric and polymeric amino-sugars / Davydova S.L., Cheevina L.V. // Zn. Anal. Khim. – 2004. – Vol. 47, №6. – P. 1076–1082.
- Determination of the nutraceutical, glucosamine hydrochloride, in raw materials, dosage forms and plasma using pre-column derivatization with ultraviolet HPLC / Zhongming Liang, James Leslie, Abimbola Adebawale et al. // School of Pharmacy. – 2009. – Vol. 63, №4. – P. 275–285.
- Optimizing high-performance liquid chromatography method for quantification of glucosamine using 6-aminoquinoly-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatization in rat plasma: application to a pharmacokinetic study / Wang X., Chen X., Chen L. et al. // Biomed. Chromatogr. – 2008. – Vol. 22, №11. – P. 1265–1271.
- Anumula K.R. Quantitative Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by High Performance Liquid Chromatography with High Sensitive Fluorescence Detection / Anumula K.R. // Anal. Biochem. – 1994. – Vol. 220, №2. – P. 275–283.
- Spectrophotometric method for determination of glucosamine in tablets / Gaonkar P., Khanvilkar V., Shettigar R. et al. // Indian J. Pharm. Sci. – 2006. – Vol. 68. – P. 83–84.
- Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. / Булатов М.И., Калинин И.П. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
- Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – Доповнення 2. – 2008. – 620 с.

Відомості про авторів:

Портна К.П., магістрант каф. аналітичної хімії ЗДМУ.

Васюк С.О., д. фарм. н., професор, зав. каф. аналітичної хімії ЗДМУ.

Надійшла в редакцію 18.04.2013 р.