

Рекомендована д. біол. наук, проф. Л. С. Фірою

УДК 543.42:615.275.074:547.459.5

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗАМІНУ В ПРЕПАРАТІ «ДОНА»

© **К. П. Портна, С. О. Васюк**

Запорізький державний медичний університет

Резюме: розроблено та валідовано нову спектрофотометричну методику кількісного визначення глюкозаміну на основі його взаємодії з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти і вимірюванні абсорбції продукту реакції в видимій ділянці спектра при довжині хвилі 510 нм. Згідно з отриманими експериментальними даними, методика може бути коректно відтворена та придатна для використання в лабораторіях Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів, а також ВТК хіміко-фармацевтичних підприємств.

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

Вступ. Глюкозамін – це хондропротектор, субстрат побудови суглобного хряща, що широко представлений низкою препаратів різних виробників, які користуються великим попитом серед хворих. Зважаючи на те, що препарати цієї групи на фармацевтичному ринку України відносно недавно, забезпечення контролю якості лікарських форм, що містять глюкозамін, є актуальною проблемою сучасного фармацевтичного аналізу [5, 6]. Вирішити це питання можливо шляхом розробки нових доступних та високочутливих методик кількісного визначення даної лікарської речовини.

У джерелах літератури є інформація про досить обмежену кількість методів визначення глюкозаміну. Так, описані способи кількісного визначення, що базуються на використанні високоефективної рідинної хроматографії для аналізу глюкозаміну, але попри високу чутливість вони є дорогими й малодоступними для рутинного контролю [2]. Що стосується дешевших та не менш надійних фізико-хімічних методів кількісного визначення глюкозаміну, то є дані відносно спектрофотометричних методик в ультрафіолетовій ділянці спектра, вагомим недоліком яких слід вважати невисоку чутливість та селективність, і методики кількісного визначення у видимій ділянці спектра, на основі взаємодії глюкозаміну гідрохлориду з ацетилацетоном і реактивом Ерліха (п-диметиламінобензальдегідом) [1, 3]. Стосовно останнього методу, то результати є вірогідними, але ця методика трудомістка, довготривала, отримані забарвлені розчини не є стабільними.

Мета роботи – розробка зручної, економічної, високочутливої методики кількісного визначення глюкозаміну у субстанції та лікарських формах на основі реакції з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти та валідація опрацьованої методики.

Методи дослідження. Для проведення дослідження використано РСЗ глюкозаміну гідрохлориду (серія ЕС № 2000-638-1); лікарські засоби – порошок для приготування розчину для перорального застосування у пакетиках «Дона» 4,0 г/1,5 г глюкозаміну («Rottapharm S.r.l.», Італія), розчин для ін'єкцій «Дона» 2 мл/0,40 г глюкозаміну («Rottapharm S.r.l.», Італія) серії 1103095 та 0112U відповідно.

Як реактив та розчинник використали натрієву сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти кваліфікації хч, 0,01 М розчин NaOH, воду дистильовану.

Аналітичне обладнання: спектрофотометр Spectord 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 в мірну колбу ємністю 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. Одержаний розчин нагрівають 3 хв на водяній бані при температурі 65 °С, охолоджують та доводять дистильованою водою до позначки. Абсорбцію досліджуваного розчину вимірюють на тлі компенсаційного розчину, що не містить досліджуваної речовини, при 510 нм.

Визначення глюкозаміну в лікарських формах

Визначення глюкозаміну у пакетиках «Дона» 4,0 г/1,5 г глюкозаміну. Весь вміст саше (1,5 г/4,0 г) переносять у мірну колбу на 100,0 мл, доводять дистильованою водою до позначки, перемішують. Одержаний розчин (5,00 мл) вміщують у мірну колбу ємністю 50,00 мл, доводять водою до позначки.

Визначення глюкозаміну в розчині для ін'єкцій «Дона» 2 мл/0,40 г. 1,00 мл ін'єкційного розчину

вміщують у мірну колбу ємністю 25,00 мл та доводять дистильованою водою до позначки. 5,00 мл одержаного розчину переносять в мірну колбу на 50,00 мл, доводять водою до позначки, перемішують.

Надалі аліквотні частини обох отриманих розчинів аналізують за загальною методикою кількісного визначення. Розрахунок проводять за типовою формулою.

Результати й обговорення. На результати проведення аналітичних реакцій впливає багато чинників, тому об'єктивний вибір оптимальних умов кількісного спектрального аналізу можливо здійснити тільки після проведення попередніх досліджень. При виборі розчинника ми враховували розчинність досліджуваних речовин, реагентів та максимальне значення оптичної густини одержаного розчину. Експериментально встановлено, що реагент взаємодіє з глюкозаміном у водному середовищі з утворенням забарвленої сполуки з максимумом світлопоглинання при 510 нм (рис. 1). При цьому оп-

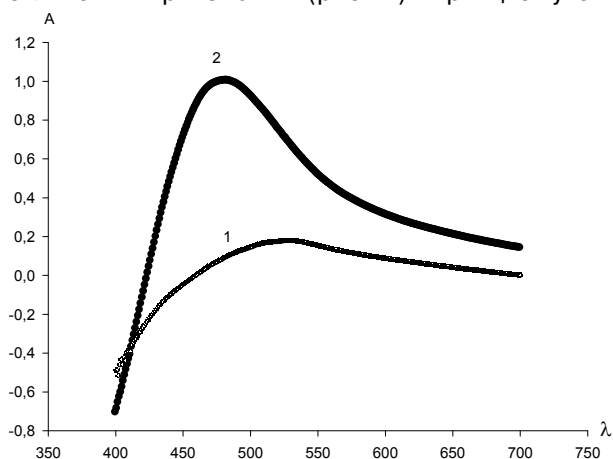


Рис. 1. Спектри поглинання: 1 – натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоокислоти, 2 – продукту реакції глюкозаміну з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоокислоти.

тимальна кількість 0,5 % реагента, необхідна для утворення продукту реакції з максимальною оптичною густиною, складає 2,00 мл.

Також для покращення результатів перебігу реакції виникла необхідність створення лужного середовища та нагрівання на водяній бані. Максимальне значення оптичної густини при додаванні 3,00 мл 0,01 М розчину NaOH і нагріванні реакційної суміші протягом 3 хв при температурі 65 °С було встановлено експериментально.

Розраховані значення межі виявлення та молярного коефіцієнта, а саме 9,53 мкг/мл та $1,1 \cdot 10^3$, відповідно, свідчать про високу чутливість реакції.

Валідація аналітичної методики

ДФУ зазначає необхідність проведення процедури валідації для методик, включених в аналітичну нормативну документацію. Такі основні валідаційні характеристики, як лінійність, прецизійність, правильність та робастність встановлено для розробленої методики згідно зі стандартизованою процедурою валідації методом стандарту [4].

Лінійна залежність оптичної густини від концентрації досліджуваних лікарських речовин спостерігається у межах 4,8–8,0 мг/100мл. Основні параметри лінійної залежності наведено в таблиці 1.

Згідно з ДФУ, методика є **точною на рівні збіжності**, якщо однобічний довірчий інтервал не перевищує максимально припустимому невизначеності аналізу. З огляду на дані, наведені у таблиці 2, методика є точною.

Правильність в обох випадках визначали методом модельних сумішей. Для 2 лікарських засобів готували по 3 модельні суміші й тричі проводили визначення з кожною з модельних сумішей (всього 9). Результати визначень можна вважати правильними, тому що систематична похибка статистично не відрізняється від

Таблиця 1. Основні параметри лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії	Висновок
«Дона», порошок у пакетиках			
$b \pm (s_b)$	0,0494±(0,0015)	–	–
$a \pm (s_a)$	0,0150±(0,0097)	$a \leq \Delta a = t(95\%;3) \cdot S_a = 0,0228$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	0,850	$\leq \Delta_{As}(\%) / t(95\%;3) = 1,360$	відповідає
r	0,9987	$\geq 0,9959$	відповідає
«Дона», розчин для ін'єкцій			
$b \pm (s_b)$	0,0414±(0,0009)	–	–
$a \pm (s_a)$	0,0061±(0,0060)	$a \leq \Delta a = t(95\%;3) \cdot S_a = 0,0140$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	0,710	$\leq \Delta_{As}(\%) / t(95\%;3) = 1,360$	відповідає
r	0,9992	$\geq 0,9926$	відповідає

Таблиця 2. Визначення збіжності результатів кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин (n=9, p=0,95)

Лікарська форма	Вміст	Метрологічні характеристики				
		\bar{X}	S	RSD	$\Delta_{x,r}$	$\Delta_{As} \%$
«Дона», порошок у пакетиках	1,50 г	1,50	$7,24 \cdot 10^{-3}$	0,483	0,903	3,20
«Дона», розчин для ін'єкцій	0,400 г	0,396	$5,04 \cdot 10^{-3}$	1,27	2,37	3,20

Таблиця 3. Визначення правильності методики із застосуванням модельних сумішей

Модельні суміші	\bar{Z}	RSD	$\Delta \bar{Z}$	$ \bar{Z} - 100 $
«Дона», порошок у пакетиках	100,3	1,11	1,01	0,300
«Дона», розчин для ін'єкцій	99,86	1,42	1,09	0,140

нуля, тобто справжнє значення величини не виходить за межі встановленого довірчого інтервалу (табл. 3).

Оцінку **робасності** проводили на стадії розробки методики та визначали стабільність аналітичних розчинів у часі та вплив кількості доданих реагентів на результати визначення. Було встановлено, що досліджувані забарвлені розчини стійкі не менше 30 хв, а коливання кількості доданого реагенту (розчину натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти) в межах $\pm 10 \%$ не впливають на величину оптичної густини.

Висновки. Визначено оптимальні умови перебігу реакції глюкозаміну гідрохлориду з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти та розроблено чутливу, економічну методику аналізу глюкозаміну у складі двох сучасних лікарських препаратів. Доведено, що розроблена методика кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин за такими характеристиками, як лінійність, прецизійність, правильність та робасність є валідною вирізняється простотою виконання та доступністю і може застосовуватись у контролі якості лікарських засобів.

Література

1. Spectrophotometric method for determination of glucosamine in tablets / P. Gaonkar, V. Khanvilkar, R. Shettigar [et al.] // Indian J. Pharm Sci. – 2006. – Vol. 68. – P. 83–84.
2. Validation of a high-performance thin-layer chromatography/densitometry method for the quantitative determination of glucosamine in a herbal dietary supplement / V. Esters, L. Angenot, V. Brandt [et al.] // Belgium J. Chromatogr. A. – 2006. – Vol. 2. – P. 64–65.
3. Компанцев Д. В. Разработка методик качественного и количественного определения глюкозамина гидрохлорида / Д. В. Компанцев, А. Э. Дерхо, Е. В. Компанцева // Журнал «Вестник», ВГУ – 2006. – № 2. –

- С. 267–270.
4. Державна Фармакопея України. – 1-ше вид. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – Доповнення 2. – 2008. – 620 с.
5. Харкевич Д. А. Фармакология: учебник для студентов высших учебных заведений / Д. А. Харкевич. – изд. 6-е, перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. – 661 с.
6. Компендиум 2008 – Лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К.: МО-РИОН, 2008. – 2250 с.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗАМИНА В ПРЕПАРАТЕ «ДОНА»

Е. П. Портная, С. А. Васюк

Запорожский государственный медицинский университет

Резюме: разработана и валидирована новая спектрофотометрическая методика количественного определения глюкозамина на основе его взаимодействия с натриевой солью 1,2-нафтохинон-4-сульфоїкислоти и измерения абсорбции продукта реакции при 510 нм. Согласно полученным экспериментальным данным, методика может быть корректно воспроизведена и пригодна для использования в лабораториях Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств, а также ОТК химико-фармацевтических предприятий.

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

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF GLUCOSAMINE IN THE DRUG «DONA»

K. P. Portna, S. O. Vasiuk

Zaporizhian State Medical University, Zaporizhia

Summary: a new spectrophotometric method for the quantitative determination of glucosamine is proposed. This method is based on the reaction with 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid sodium salt and the formation of coloured products that exhibit absorption maxima at 510 nm. According to the experimental data, the technique can be correctly reproduced and is suitable for using in laboratories of the State Inspectorate for Quality Control of Medicines and QCD of the chemicopharmaceutical enterprises.

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