

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗАМИНА ГИДРОХЛОРИДА И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ СУХОГО ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ БЕРЕЗЫ ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ ПРИСУТСТВИИ

Д. В. Компанцев, А. Э. Дерхо, Е. В. Компанцева

Пятигорская государственная фармацевтическая академия

Предложены методики идентификации глюкозамина гидрохлорида и фенольных соединений сухого экстракта листьев березы в модельной смеси методом хроматографии в тонком слое сорбента. Разработаны методики количественного определения каждого из компонентов, входящих в модельную смесь, спектрофотометрическим методом. Установлено, что погрешность результатов определения количественного содержания не превышает 3,2% для суммы фенольных соединений сухого экстракта листьев березы и 2,8 % для глюкозамина гидрохлорида.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы для лечения остеоартроза (ОА) используются комбинированные препараты, в состав которых входят соли глюкозамина, хондроитина сульфат и различные биологически активные вещества препаратов растительного происхождения. Известно, что длительное применение солей глюкозамина вызывает побочные эффекты, в первую очередь со стороны желудочно-кишечного тракта. Проведенные в ПятГФА под руководством профессора В.А. Компанцева исследования позволили предложить новый лекарственный препарат, в котором предусмотрено снижение побочного действия глюкозамина гидрохлорида за счет его сочетания с пектином — гранулы глюкозамина с пектином [1]. С целью увеличения фармакологического эффекта, направленного на лечение ОА, нами предложено ввести в состав гранул сухой экстракт листьев березы (СЭЛБ). В народной медицине листья березы нашли широкое применение в качестве противовоспалительного, ранозаживляющего, общеукрепляющего, мочегонного средства. Описано применение листьев березы для лечения ОА, особенно коленных суставов, а также гастрита с повышенной кислотностью [1,2]. Основным действующим веществом СЭЛБ являются флавоноиды (в пересчете на рутин не менее 5%).

Целью данного исследования явилась разработка методик качественного определения глюкозамина гидрохлорида и СЭЛБ методом хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ) и количественного определения указанных веществ методом спектрофотометрии при их совместном присутствии.

МАТЕРИАЛЫ

Объектом исследований явилась модельная смесь, состава: глюкозамина гидрохлорида 0,5000 г, сухого экстракта листьев березы 0,0500 г, сахара 0,2500 г, пектина 0,2500 г. Для качественного анализа использовали надосадочную жидкость, полученную путем тщательного взбалтывания 0,55 г модельной смеси с 25 мл спирта этилового 50% или воды.

Хроматографические пластинки «Сорбфил» (ТУ 26-11-17-89).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Качественный анализ флавоноидов СЭЛБ проводили методом ТСХ (ВФС 42-2732-96 «Экстракт березы сухой»). На линию старта хроматографической пластинки в виде полосы длиной 2,5 см наносили 50 мкл надосадочной жидкости в спирте, 50 мкл 0,2% СЭЛБ в спирте этиловом 50% и 10 мкл 1% раствора глюкозамина гидрохлорида в спирте этиловом 50%. После нанесения растворов пластинку сушили в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 5 мин, затем помещали в хроматографическую камеру. В качестве системы растворителей использовали смесь: этилацетат — уксусная кислота — вода в соотношении 20:4:1. После прохождения фронта растворителей 10 см пластинку вынимали из камеры и подсушивали на воздухе в течение 5 мин, опрыскивали 2% спиртовым раствором алюминия хлористого свежеприготовленного. Пластинку сушили в сушильном шкафу при температуре 105°С и просматривали в УФ-свете при длине волны 360 нм. Затем пластинку обрабатывали 0,5% раствором нингидрина в спирте 95% и нагревали в сушильном шкафу при 105 °С в течение 3—5 минут.

Результаты статистической обработки данных,
полученных при изучении линейной зависимости вида $y = bx + a$

x_{cp}	y_{cp}	b	a	R	S^2_0
Глюкозамина гидрохлорид (реакция Эльсона — Моргана)					
0,0015	0,600	325,09	0,187	0,997	0,0349789
Рутин (реакция со спиртовым раствором алюминия хлорида)					
0,0015	0,775	512,71	0,005	0,998	0,057507

Идентификацию глюкозамина гидрохлорида проводили методом ТСХ (ФСП 42-0068-2823-02). На линию старта хроматографических пластинок наносили 10 мкл надосадочной жидкости модельной смеси в воде. Рядом наносили 10 мкл (100 мкг) 1% раствора РСО глюкозамина гидрохлорида и 10 мкл 0,1% водного раствора СЭЛБ. Концентрацию раствора РСО СЭЛБ подбирали таким образом, чтобы его содержание совпадало с содержанием экстракта в нанесенной пробе). Пластины высушивали на воздухе и хроматографировали в системе растворителей спирт *n*-бутиловый — вода — спирт этиловый 95% — кислота уксусная ледяная (3,4 : 2,5 : 2,0 : 0,5). Когда фронт смеси растворителей проходил 10 см, их вынимали из камеры и подсушивали на воздухе. Одну пластинку обрабатывали 0,5% раствором нингидрина в спирте 95% и нагревали в сушильном шкафу при 105°C в течение 3—5 минут. Другую пластинку опрыскивали 2% спиртовым раствором алюминия хлористого свежеприготовленного, сушили в сушильном шкафу при температуре 105 °С и просматривали в УФ-свете при длине волны 360 нм.

Количественное определение глюкозамина гидрохлорида проводили по известной специфичной методике фотометрического определения по реакции с ацетилацетоном и *n*-диметиламинобензальдегидом (метод Эльсона-Моргана), которая имеет высокую чувствительность (ФСП 42-0068-2823-02).

Количественное определение суммы фенольных соединений в СЭЛБ в пересчете на рутин проводили по реакции взаимодействия фенольных соединений со спиртовым раствором алюминия хлорида методом спектрофотометрии (ВФС 42-2732-96). С учетом содержания суммы фенольных соединений в пересчете на рутин в СЭЛБ (не менее 5%) в модельной смеси этой суммы должно быть не менее 0,0025 г.

Предварительно в условиях проведения реакции Эльсона-Моргана и реакции определения рутина со спиртовым раствором алюминия хлорида установили возможность определения глюкозамина гидрохлорида и рутина в СЭЛБ в смеси с сопутствующими ингредиентами. Установлено, что входящие в пропись компоненты не мешают как количественному определению глюкозамина гидрохлорида, так и количественному определению рутина в СЭЛБ.

В рамках валидационной оценки предложенных методик с целью определения линейности результатов строили градуировочные графики.

Содержание суммы фенольных соединений СЭЛБ в модельной смеси в пересчете на рутин (X) в граммах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot a_{AB} \cdot 50 \cdot P}{D_{cm} \cdot a}$$

Содержание глюкозамина гидрохлорида (X) в граммах в модельной смеси рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \cdot a_{AB} \cdot P}{D_{cm} \cdot a}$$

где D и D_{cm} — оптические плотности анализируемого раствора и раствора РСО рутина (или глюкозамина гидрохлорида) соответственно; a — масса модельной смеси в граммах, взятая на анализ; P — масса модельной смеси в граммах; a_{cm} — масса РСО рутина или глюкозамина гидрохлорида в граммах.

Проведена оценка воспроизводимости результатов предложенных методик. Результаты определений представлены в табл. 2, 3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При проведении методики качественного определения флавоноидов СЭЛБ методом ТСХ на хроматографической пластинке наблюдались три

пятна: первое на старте — голубого цвета; второе — светло-желтого цвета; третье — желтого цвета. Расположение пятен СЭЛБ и модельной смеси совпадали и имели R_f 0,43 и R_f 0,62. На хроматограмме, обработанной 0,5% раствором нингидрина, наблюдалась размытая полоса большой площади с R_f 0,12 как в модельной смеси, так и на уровне пятна РСО глюкозамина гидрохлорида. Это можно объяснить большим содержанием глюкозамина гидрохлорида в пробе.

При проведении испытаний на подлинность глюкозамина гидрохлорида на хроматограмме модельной смеси и глюкозамина гидрохлорида наблюдалось одно пятно красно-бурого цвета на уровне пятна РСО глюкозамина гидрохлорида с R_f 0,61. Компоненты СЭЛБ не проявлялись в данной системе растворителей, очевидно из-за малой концентрации нанесенной пробы. Таким образом, использование системы растворителей, предложенной ВФС 42-2732-96, позволяет идентифицировать только флавоноиды СЭЛБ, а в системе растворителей, описанных в ФСП 42-0068-2823-02, можно

достоверно обнаружить глюкозамина гидрохлорид. При этом нецелесообразно проводить обнаружение каждого ингредиента модельной смеси в обеих системах растворителей.

Результаты градуировки, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что в условиях выбранных методик наблюдается прямолинейная зависимость оптических плотностей растворов от концентраций рутина и глюкозамина гидрохлорида. Значение коэффициента корреляции позволяет судить о том, что выбранные методики могут быть использованы для анализа данной композиции в диапазоне концентраций для рутина 0,0004 — 0,004% и глюкозамина гидрохлорида 0,0005 — 0,005%. Таким образом, анализируемая концентрация рутина (0,0015%) и глюкозамина гидрохлорида (0,0015%) находится в указанном выше интервале концентраций.

Представленные в таблице 2, 3 данные свидетельствуют о хорошей воспроизводимости результатов и правильности методики как при анализе глюкозамина гидрохлорида, так и при анализе

Таблица 2

Результаты спектрофотометрического определения суммы фенольных соединений СЭЛБ

Взято, г	Dст	D	Найдено, г	Метрологические характеристики
2,09830	0,403	0,231	0,00359	$\bar{x} = 0,00350$ $S = 0,0001$ $S\bar{x} = 4,33 \cdot 10^{-5}$ $\Delta\bar{x} = 0,00011$ $\varepsilon = \pm 3,2\%$
2,10930		0,232	0,00358	
2,10950		0,233	0,00359	
2,10575		0,222	0,00343	
2,10375		0,215	0,00333	
2,09985		0,226	0,00350	

Таблица 3

Результаты спектрофотометрического определения глюкозамина гидрохлорида

Взято, г	Dст	D	Найдено, г	Метрологические характеристики
1,05280	0,649	0,645	0,47320	$\bar{x} = 0,47041$ $S = 0,00508$ $S\bar{x} = 0,00207$ $\Delta\bar{x} = 0,00533$ $\varepsilon = \pm 2,8\%$
1,04898		0,653	0,47901	
1,04868		0,638	0,46814	
1,04820		0,633	0,46442	
1,04836		0,640	0,46962	
1,04880		0,638	0,46811	

фенольных соединений в СЭЛБ. Установлено, что погрешность результатов определения количественного содержания не превышает 3,2% для суммы фенольных соединений сухого экстракта листьев березы и 2,8 % для глюкозамина гидрохлорида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для идентификации глюкозамина гидрохлорида и фенольных соединений СЭЛБ в модельной смеси возможно использование методик ТСХ, описанных в соответствующих нормативных документах (ВФС 42-2732-96 «Экстракт березы сухой» и ФСП 42-0068-2823-02 «Таблетки глюкозамина гидрохлорида»). Установлено, что использование методик количественного определения глюкозамина гидрохлорида и фенольных соединений СЭЛБ позволяет определять каждый компонент при совместном присутствии. Разработанные методики качественного и количественного определения могут быть использованы для анализа глюкозамина гидрохлорида и СЭЛБ в предложенных гранулах противоартрозного действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пат. 2130310 РФ, МКИ⁶ А 61 К 31/70. Композиция — лекарственная форма противоартрозного средства глюкозамина гидрохлорида для внутреннего применения / Компанцев В.А., Самокиш И.И., Казаков А.Л. и др (РФ). — №96110610/14; Заявл. 28.05.96; Оpubл. 20.05.99. — 8 с.
2. *Ранн О.А.* Некоторые фармакологические свойства препаратов из разных органов и частей *Betula Pendula Roth* / *О.А. Ранн, В.Г. Папинский* // Растительные ресурсы. — 1994. — Т. 30, вып. 1—2. — С. 93—98.
3. *Куцик Р.В.* Береза бородавчатая (береза повислая) аналитический обзор / Р.В. Куцик, Б.М. Зузук // Провизор. — 2001. — № 10. — С. 17—20.
4. Государственная фармакопея СССР: Общие методы анализа / МЗ СССР. — 11 изд., доп. — М.: 1987. — Вып. 1. — 336 с.