

УДК: 543.4

Ж. О. Кормош – кандидат хімічних наук, професор, завідувач кафедри аналітичної хімії та екотехнологій Волинського національного університету імені Лесі Українки

Методика визначення хондроїтинсульфату методом резонансної світлової спектроскопії

Роботу виконано на кафедрі аналітичної хімії та екотехнологій ВНУ ім. Лесі Українки

Установлено, що хондроїтинсульфат із поліметиновим барвником ДНАФ утворює іонний асоціат. У його резонансних спектрах випромінювання спостерігається аналітичний сигнал при 590 нм. Оптимізовано умови утворення та розроблено методику визначення хондроїтинсульфату.

Ключові слова: іонний асоціат, хондроїтинсульфат, резонансна світлова спектроскопія.

Кормош Ж. А. Методика определения хондроитисульфата методом резонансной световой спектроскопии. Установлено, что хондроитисульфат с полиметиновым красителем ДНАФ образует ионный ассоциат. В его резонансных спектрах излучения наблюдается аналитический сигнал при 590 нм. Оптимизированы условия образования и разработана методика определения хондроитисульфата.

Ключевые слова: ионный ассоциат, хондроитисульфат, резонансная светловая спектроскопия.

Kormosh Zh. O. The Chondroitin Sulfate Determination by Light Resonance Spectroscopy Methode.

Found that chondroitin sulfate of polymethine dyes DNAF forms of ion associates. In his resonant emission spectra observed analytical signal at 590 nm. Optimized conditions for the formation and developed a method of chondroitin sulfate determination.

Key words: ion associate, chondroitin sulfate, resonance light spectroscopy.

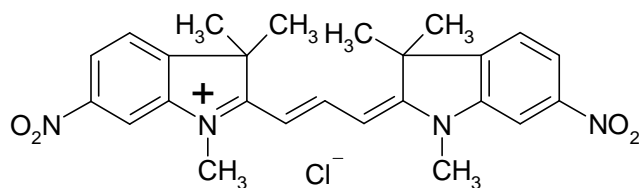
Постановка наукової проблеми та її значення. Збільшення асортименту фармацевтичних препаратів потребує розширень наукових досліджень у галузі розроблення нових, а також удосконалення наявних методів їх хіміко-аналітичного контролю. Розроблення методів хімічного та токсикологічного аналізу лікарських засобів є актуальним завданням аналітичної, фармацевтичної і токсикологічної хімії, оскільки перелік імпортованих та вітчизняних лікарських препаратів, що пропонуються на фармацевтичному ринку України, постійно розширюється.

Один із методів, що задовольняє вимоги можливості надійного визначення компонентів в аналіті, – це резонансна світлова спектроскопія (РСС). Резонансна світлова спектроскопія є новим аналітичним методом, що був розроблений у 90-х рр. минулого століття й відразу привернув до себе увагу через високу чутливість і відносну простоту у виконанні експерименту. Останнім часом вона все більше застосовується для визначення біомакромолекул, наркотичних речовин, органічних та неорганічних іонів і дослідження наночастинок [3].

Хондроїтинсульфат (ХС), природний високомолекулярний полісахарид, є природним компонентом хряща та відіграє біологічно активну роль у багатьох процесах метаболізму його різних структур. Його роль полягає у виконанні опорної функції кісткової і хрящової тканини. Він уповільнює резорбцію кісткової тканини, знижує втрату кальцію, покращує фосфорно-кальцієвий обмін у хрящовій тканині, прискорює процеси її відновлення, гальмує процеси руйнування хрящової і сполучної тканини. ХС пригнічує ферменти, що викликають ураження хрящової тканини, стимулює синтез ГАГ, збільшує продукування внутрішньосуглобної рідини [1, 2]. Широке використання лікувальних засобів на основі ХС вимагає розроблення надійних методів його аналітичного контролю.

Мета роботи полягає в дослідженні взаємодії хондроїтинсульфату з 6,6'-динітро-астрафлосинном методом резонансної світлової спектроскопії та розроблення методики визначення хондроїтинсульфату.

Матеріали і методи. У роботі використовували хондроїтинсульфат фармакопейної чистоти. Як реагент використовували катіонний поліметиновий барвник (ПБ) – 6,6'-динітро-астрафлосин (ДНАФ):



Цей реагент має інтенсивне забарвлення і стійкий до протолітичних перетворень у широких межах рН. Вихідний стандартний розчин реагенту (10^{-3} моль/л) готували розчиненням його точної наважки в дистильованій. Робочі розчини готували послідовним розведенням вихідного в день експерименту.

Спектри поглинання реєстрували за допомогою спектрофотометра СФ-2000 виробництва «ЛОМО» (Росія) у кварцових кюветах 1x1 см. Резонансні спектри реєстрували за допомогою спектрофлуориметра «Флюорат ПАНОРАМА» виробництва «ЛОМО» (Росія) у кварцових кюветах 1x1 см у режимі синхронного сканування із кроком 5 нм ($\lambda_{зб} = \lambda_{випр}$).

Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження. Під час взаємодії хондроїтинсульфату з ДНАФ у спектрах поглинання з'являється «плече» при 550 нм. Це свідчить про утворення іонних асоціатів (ІА) у J-агрегатів за рахунок іонно-асоціативного зв'язку за атомом Нітрогену індоленіна ДНАФ та сульфатної групи ХС. Поява «плеча» при 550 нм у спектрі поглинання ІА може бути використана як аналітичний сигнал для визначення хондроїтинсульфату. Однак через поглинання самого реагенту при цій же довжині хвилі контрастність реакції бажає кращого.

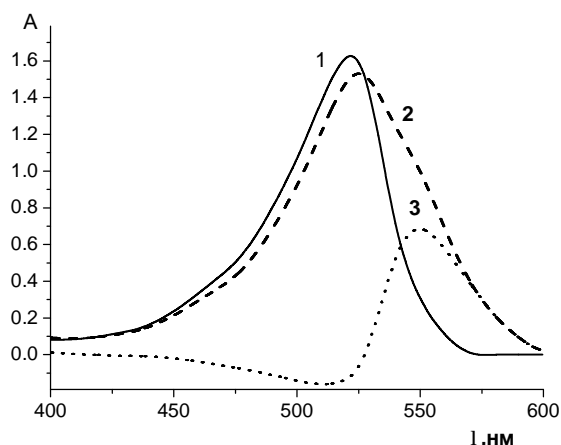


Рис. 1. Спектри поглинання ДНАФ (1), іонного асоціату ДНАФ із хондроїтинсульфатом (2) та різницевий спектр (3)

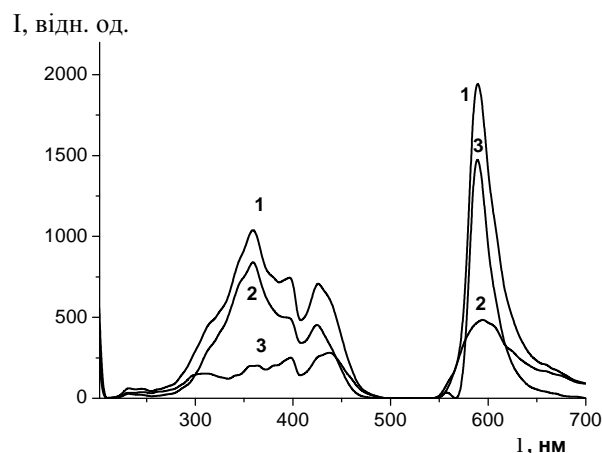


Рис. 2. Резонансний спектр ІА ДНАФ з ХС (1), ДНАФ (2) та різницевий спектр (3)

У резонансних спектрах випромінювання ІА іонного асоціату ДНАФ із ХС в області 590-610 нм спостерігається контрастний аналітичний сигнал (рис. 2, спектр 3). Для отримання стабільного в часі аналітичного сигналу оптимізовано умови. Установлено, що надійний аналітичний сигнал утворюється в присутності неіоногенної поверхнево-активної речовини тритон Х-100. Це пов'язано з тим, що під час утворення іонного асоціату отримуємо нанодисперсну систему, здатну до агрегації. Уведенням тритону Х-100 забезпечуємо агрегативну стійкість системи та відтворюваність аналітичного сигналу. Задовільна солюбілізація забезпечується при вмісті $(0,4 - 2,5) \cdot 10^{-4}$ % (ваг.) тритону Х-100. Аналітичний сигнал стабільний при концентрації ДНАФ у межах $(0,4 - 1,6) \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Для розроблення методики визначення будь-якої речовин важливим є знання інтервалу лінійності зміни аналітичного сигналу від концентрації визначуваного компонента. Як видно з рис. 3, у дослідженій системі аналітичний сигнал зростає зі збільшенням ХС в аналізі в межах до 1,6 мкг/мл (8 мкг).

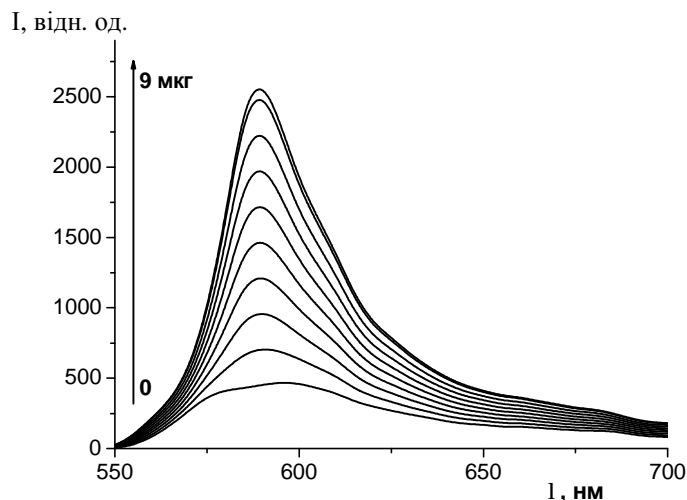


Рис. 3. Залежність інтенсивності аналітичного сигналу від вмісту ХС у мкг/мл

В оптимальних умовах утворення ІА й аналітичного сигналу побудований калібрувальний графік для визначення гепарину. Як видно з рис. 3, він лінійний до 1,6 мкг/мл ХС і описується рівнянням $I = 455 + 252 \cdot C_{ХС}$.

На основі отриманих результатів розроблено методику визначення ХС, яка апробована на модельних розчинах. У градувальну пробірку вносять аналіт, що містить до 8 мкг хондроїтинсульфату, додають 0,5 мл $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л ДНАФ, 0,5 мл 0,01 % розчину тритону Х-100, доводять дистильованою водою до 5 мл і перемішують. Інтенсивність аналітичного сигналу вимірюють за допомогою спектрофлуориметра в режимі синхронного сканування при 590 нм. Вміст хондроїтинсульфату визначають за калібрувальним графіком, побудованим в ідентичних умовах. Результати визначення хондроїтинсульфату наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Результати визначення ХС у модельних розчинах методом «введено – знайдено»

№ проби	Введено ХС, мкг	Знайдено ХС, мкг	Sr
1	4	$4,1 \pm 0,1$	0,04
2	6	$6,1 \pm 0,2$	0,05
3	8	$7,9 \pm 0,2$	0,03

Як видно з табл. 1, методика характеризується добрими метрологічними параметрами, Sr не перевищує 0,05 і може бути використана під час визначення хондроїтинсульфату в біологічних рідинах.

Висновки й перспективи подальших досліджень. Установлено, що хондроїтинсульфат із поліметиновим барвником ДНАФ утворює іонний асоціат. У його резонансних спектрах випромінювання спостерігається аналітичний сигнал при 590 нм. Оптимізовано умови утворення та розроблено методику визначення хондроїтинсульфату.

Список використаної літератури

1. Государственный реестр лекарственных средств. Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России. – 8-е изд. – М., 2004. – Т. Н. – С. 1615–1617.
2. Панасюк А. Ф. Хондроитинсульфаты и их роль в обмене хондроцитов и межклеточного матрикса хрящевой ткани / А. Ф. Панасюк, Е. В. Ларионов // Науч.-практ. ревматология. – 2000. – № 2. – С.46–55.
3. Resonance light scattering and derived techniques in analytical chemistry: past, present, and future / Wei Lu, Beatriz S. Ferna'ndez Band, Yu Yu, Qin Geng Li, Jing Chuan Shang, Chi Wang, Yan Fang, Rui Tian, Li Ping Zhou, Li Li Sun, Yu Tang, Shu Hua Jing, Wei Huang, Ji Ping Zhang // Microchim Acta. – 2007. – V. 158. – P. 29–58.

Стаття надійшла до редколегії
12.04.2012 р.