

УДК 615.324; 532.132

# РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКОЙ ВЯЗКОСТИ ИНЪЕКЦИОННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА НАТРИЯ

К.Р. Савельева<sup>1\*</sup>, Л.В. Персанова<sup>1</sup>, В.Н. Шестаков<sup>1</sup>, С.В. Поляков<sup>1</sup>

**Резюме.** В статье представлены данные по разработке методики определения характеристической вязкости инъекционного препарата на основе хондроитина сульфата натрия. В качестве растворителя для устранения полиэлектролитного набухания был использован 0,2 М раствор натрия хлорида. Расчет приведенной вязкости испытуемых растворов был произведен в концентрационном диапазоне хондроитина сульфата 4,5–20 мг/мл. Значение характеристической вязкости, определенной для каждого из испытуемых препаратов, находилось в интервале 0,03–0,042 м<sup>3</sup>/кг.

**Ключевые слова:** хондроитин сульфат, лекарственный препарат, раствор для внутримышечного введения, приведенная вязкость, характеристическая вязкость.

## DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF INTRINSIC VISCOSITY OF INJECTABLE DRUG WITH CHONDROITIN SULFATE

K.R. Saveleva<sup>1\*</sup>, L.V. Pesanova<sup>1</sup>, V.N. Shestakov<sup>1</sup>, S.V. Poliyakov<sup>1</sup>

**Abstract.** The article presents data on the development of a technique for determination of intrinsic viscosity of injectable drug with chondroitin sodium sulfate. A 0.2 M solution of sodium chloride was used as a solvent to eliminate polyelectrolyte swelling. The calculated viscosity of the test solutions was determined in the concentration range of chondroitin sulfate 4.5–20 mg/ml. The value of the intrinsic viscosity, determined for each of the tested preparations, was in the range 0.03–0.042 m<sup>3</sup>/kg.

**Keywords:** chondroitin sulfate, drug, intramuscular solution, reduced viscosity, intrinsic viscosity.

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, 109044, Россия, г. Москва, Лавров переулок, д. 6

1 – State Institute of Drugs and Good Practices of the Ministry of Industry and Trade of Russian Federation, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

\* адресат для переписки:

E-mail: saveleva@gilsinp.ru

Тел.: 8 (495) 676 43 60, доб. 2-28

## ВВЕДЕНИЕ

Хондроитин сульфат (ХС) – это высокомолекулярный гетерополисахарид, который относится к группе гликозаминогликанов, линейных неразветвленных полимеров. Линейная цепь построена из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и сульфатированного N-ацетил-D-галактозамина, которые попарно соединены β-1,3-гликозидными связями и образуют дисахаридные фрагменты; последние, в свою очередь, соединены β-1,4-гликозидными связями (рисунок 1) [1].

Подобное строение молекулы хондроитина сульфата обуславливает ее полианионные свойства и участие в процессах транспорта воды, аминокислот и липидов в аваскулярных участках хряща. Длинные цепи ХС, входящие в состав экстрацеллюлярного матрикса, определяют важнейшие биомеханические свойства хрящевой ткани. Уникальные особенности этой молекулы и легли

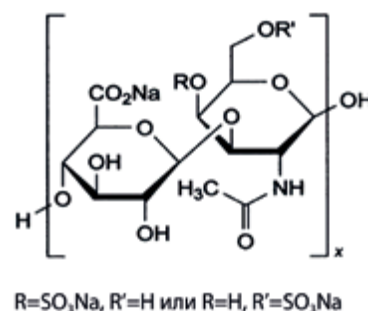


Рисунок 1. Общая химическая структура хондроитина сульфата натрия [2]

в основу идеи применения ХС при остеоартрите (ОА). Хондроитин сульфат – структурный модулятор, который не только синтезируется организмом, но также после введения встраивается в структуры хрящевой ткани, стимулируя ее синтез и ингибируя деструкцию. Его своевременное назначение и регулярное использование обеспечи-

вают торможение, стабилизацию и профилактику развития деструктивных процессов в суставе [3].

В настоящее время инъекционные лекарственные препараты на основе хондроитина сульфата натрия получили широкое распространение на отечественном фармацевтическом рынке. Качество готового лекарственного препарата напрямую зависит от качества субстанции. От значения молекулярной массы субстанции хондроитина сульфата зависит его вязкость и, как следствие, степень болезненности инъекций, возникновение уплотнений и геморрагий в месте инъекций и в редких случаях инфильтратов [4]. Вискозиметрия является одним из наиболее доступных и информативных методов исследования растворов полимеров. На основе экспериментальных данных можно определить молекулярные характеристики макромолекул. Для определения молекулярной массы и качества растворителя используется характеристическая вязкость, которая определяется из начального наклона концентрационной зависимости удельной вязкости [5]. Характеристической вязкостью называют предельное значение отношения удельной вязкости к концентрации раствора при концентрации, стремящейся к нулю. Данную величину определяют путем графической экстраполяции значений отношения приведенной вязкости к концентрации, полученных для нескольких концентраций, к оси ординат.

Водные растворы ионизированных макромолекул хондроитина сульфата имеют аномальную зависимость приведенной вязкости от концентрации раствора: их приведенная вязкость растет с уменьшением концентрации полиэлектrolита, что делает невозможным определение характеристической вязкости раствора полиэлектrolита. Возрастание приведенной вязкости водного раствора полиэлектrolита при разбавлении вызвано так называемым полиэлектrolитным набуханием, то есть увеличением объема и линейных размеров макромолекулярных клубков из-за усиления электростатического отталкивания одноименно заряженных звеньев цепи.

Полиэлектrolитное набухание устраняется либо в присутствии избытка нейтрального низкомолекулярного электrolита, либо при поддержании постоянной ионной силы в растворе в ходе разбавления. Тогда концентрация компенсирующих противоионов в молекулярных клубках не изменяется при разбавлении и полиэлектrolит ведет себя в растворе как незагрязненный полимер.

Для получения прямолинейной зависимости приведенной вязкости от концентрации водный раствор полиэлектrolита разбавляли растворами соли разных концентраций. Ионная сила раствора в ходе разбавления остается постоянной, а подобранная концентрация низкомолекулярного электrolита в точности равняется ионной силе исходного раствора полиэлектrolита [6].

Целью настоящего исследования является разработка методики определения характеристической вязкости лекарственных препаратов на основе хондроитина сульфата.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы инъекционные препараты на основе хондроитина сульфата: «Мукосат», раствор для внутримышечного введения, 100 мг/мл, 2 мл (ООО «Диамед-Фарма»); «Хондрогард», раствор для внутримышечного введения, 100 мг/мл, 2 мл (ЗАО «ФармФирма «Сотекс», серия 170317, годен до 03.2020); «Драстоп», раствор для внутримышечного введения, 100 мг/мл, 2 мл («Уорлд Медицин Лимитед», Великобритания, производитель К.О. «Ромфарм Компани С.Р.Л.», Румыния, серия 1701941, годен до 03.2020). Составы препаратов приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Состав лекарственных препаратов на основе хондроитина сульфата

Компонент	Масса, мг (Объем, мл)		
	«Мукосат»	«Хондрогард»	«Драстоп»
Хондроитина сульфат	200 мг	200 мг	200 мг
Бензиловый спирт	18 мг	18 мг	24 мг
1% раствор натрия гидроксида или 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты	до рН 6,0-7,5	до рН 6,0-7,5	до рН 6,5-6,8
Натрия метабисульфит	–	2,0 мг	–
Вода для инъекций	до 2,0 мл	до 2,0 мл	до 2,0 мл

В ходе работы использованы следующие реактивы: натрия хлорид (99,5%, Panreac, Испания, кат. № 131659), цетилпиридиния хлорид ( $\geq 99\%$ , C9002, Sigma-Aldrich, США, кат. № 6004-24-6); стандартный образец Европейской Фармакопеи хондроитина сульфата натрия № Y0000280, серия 2.0, идентификационный номер 003U61; мембранный фильтр диаметром 33 мм типа Millex-HA с размером пор 0,45 мм.

Аппаратура: весы аналитические неавтоматического действия Secura 225D-10RU (класс точности специальный – I по ГОСТ OIML R 76-1-2009, Sartorius, Германия); титратор автоматический Т 50 в комплекте с фототродом DP5 (Mettler Toledo, Швейцария); капиллярный вискозиметр (внутренний диаметр капилляра 0,54 мм); секундомер «Агат» СОСпр-26-2-000.

### Экспериментальная часть

1. *Приготовление растворов для количественного определения хондроитина сульфата натрия в лекарственных препаратах.*



**Весы аналитические неавтоматического действия  
Secura 225D-10RU (Sartorius, Германия)**

*Стандартный раствор хондроитина сульфата натрия.* 0,025 г (точная навеска) стандартного образца хондроитина сульфата натрия (предварительно высушенного при температуре 105 °С в течение 4 ч) помещают в мерную колбу объемом 25 мл, растворяют в воде, раствор доводят до метки тем же растворителем, фильтруют через мембранный фильтр типа Millex-NA с размером пор 0,45 мкм или аналогичный. 2,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, раствор доводят до метки водой.

*Испытуемый раствор.* 1 мл препарата помещают в мерную колбу объемом 100 мл, разбавляют водой, доводят объем раствора до метки тем же растворителем. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр типа Millex-NA с размером пор 0,45 мкм или аналогичный. 2,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл и доводят объем раствора до метки водой.

*Раствор титранта.* 0,5 г цетилпиридиния хлорида моногидрата помещают в мерную колбу объемом 500 мл, растворяют в воде, доводят до метки тем же растворителем.

#### 2. Методика проведения титрования.

По 50 мл стандартного и испытуемого растворов были оттитрованы раствором титранта цетилпиридиния хлорида. Для определения конечной точки титрования использовали автотитратор, снабженный фототродом с длиной волны в видимой области 520 нм.

#### 3. Приготовление растворов для определения характеристической вязкости

*Раствор натрия хлорида.* 1,7 натрия хлорида помещают в мерную колбу объемом 1 л, растворяют в 950 мл воды, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Перед использованием раствор фильтруют через мембранный фильтр на основе смешанных эфиров целлюлозы типа Millex-NA или аналогичного

качества с диаметром пор не более 0,45 мкм. Срок годности – 2 недели при хранении в холодильнике.

*Испытуемый раствор 1.* 20 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл раствора натрия хлорида, доводят объем до метки тем же растворителем. Раствор перемешивают при комнатной температуре и фильтруют через мембранный фильтр на основе смешанных эфиров целлюлозы типа Millex-NA или аналогичного качества с диаметром пор не более 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

*Испытуемый раствор 2.* К 15 мл испытуемого раствора 1 прибавляют 5 мл раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают.

*Испытуемый раствор 3.* К 12,5 мл испытуемого раствора 1 прибавляют 7,5 мл раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают.

*Испытуемый раствор 4.* К 10 мл испытуемого раствора 1 прибавляют 10 мл раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают.

*Испытуемый раствора 5.* К 5 мл испытуемого раствора 1 прибавляют 15 мл раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают.

#### 4. Методика проведения испытания

В колено трубки вискозиметра наливают объем жидкости, равный 20 мл. Вискозиметр помещают в вертикальном положении в водяной термостат с температурой 25±0,1 °С, удерживая его в этом положении не менее 30 мин для установления температурного равновесия. Измеряют время истечения испытуемых растворов и натрия хлорида с точностью до 0,2 с [7]. Время истечения испытуемой жидкости определяют как среднее не менее чем трех измерений.

Концентрацию испытуемого раствора в мг/мл рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{V \cdot X \cdot a}{100}$$

Значение приведенной вязкости (м<sup>3</sup>/кг) рассчитывали по формуле:

$$\eta_{\text{прив}} = \frac{(\tau - \tau_0) \cdot 100}{\tau_0 \cdot V \cdot X \cdot a}$$

где  $\tau$  – время истечения испытуемого раствора в секундах;  $\tau_0$  – время истечения раствора натрия хлорида в секундах;  $V$  – объем препарата в миллилитрах;  $a$  – коэффициент, учитывающий разведение, равный 0,75 для испытуемого раствора 2, 0,625 – для испытуемого раствора 3, 0,5 – для испытуемого раствора 4, 0,25 – для испытуемого раствора 5;  $X$  – содержание хондроитина сульфата в лекарственном препарате в мг/мл.

Строят график зависимости приведенной вязкости от концентрации хондроитина сульфата. Точка пересечения полученной прямой с осью ординат (при нулевой концентрации) дает величину характеристической вязкости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение количественного содержания хондроитина сульфата натрия в исследуемых препаратах было проведено для точного построения графика зависимости приведенной вязкости от концентрации лекарственного препарата. Определение количественного содержания хондроитина сульфата в испытуемых инъекционных препаратах было проведено методом турбидиметрического титрования раствором цетилпиридиния хлорида. Добавление цетилпиридиния хлорида к раствору хондроитина сульфата приводит к образованию нерастворимой ионной пары с сульфатной группировкой. Получившийся продукт образует преципитаты в растворе, что ведет к возрастанию мутности, которая может быть измерена с помощью фототрода при 520 нм, погруженного в раствор образца. Результаты турбидиметрического титрования представлены в таблице 2. Стандартные и испытуемые растворы были приготовлены в шести повторениях.

Таблица 2.

Результаты турбидиметрического титрования

№ п/п	Объем титранта, пошедший на титрование, мл			
	Стандартный образец	«Мукосат»	«Хондрогард»	«Драстоп»
1	3,922	3,993	4,005	3,863
2	3,937	4,016	3,990	3,611
3	3,907	3,992	4,105	3,882
4	4,015	3,975	3,961	3,696
5	3,982	4,105	4,086	3,735
6	4,064	4,061	3,866	3,792
Среднее	3,971	4,024	4,002	3,763
Содержание хондроитина сульфата, мг/мл		99,5	99,0	93,1

Для получения прямолинейной зависимости приведенной вязкости от концентрации лекарственные препараты для внутримышечного введения на основе хондроитина сульфата разбавляли раствором натрия хлорида. Ионная сила раствора в ходе разбавления остается постоянной, а подобранная концентрация низкомолекулярного электролита в точности равняется ионной силе исходного раствора полиэлектролита. На основании методики определения характеристической вязкости субстанции хондроитина сульфата натрия [2] в качестве низкомолекулярного электролита для подавления полиэлектролитного набухания был использован 0,2 М раствор натрия хлорида. Сред-

нее время истечения раствора натрия хлорида составило 76,3 с.

Результаты расчета среднего времени истечения испытуемых растворов препарата «Мукосат» и рассчитанные значения приведенной вязкости представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Результаты расчета приведенной вязкости препарата «Мукосат»

Препарата «Мукосат» раствор для внутримышечного введения 100 мг/мл					
Испытуемый раствор	1	2	3	4	5
Концентрация, мг/мл	19,9	14,925	12,44	9,95	4,975
Среднее время истечения	139,3	120,7	112,3	104,0	89,0
Вязкость приведенная, м <sup>3</sup> /кг	0,0415	0,0389	0,0378	0,0364	0,0333

На основании вышеприведенных результатов был получен график зависимости приведенной вязкости от концентрации препарата «Мукосат», который представлен на рисунке 2.

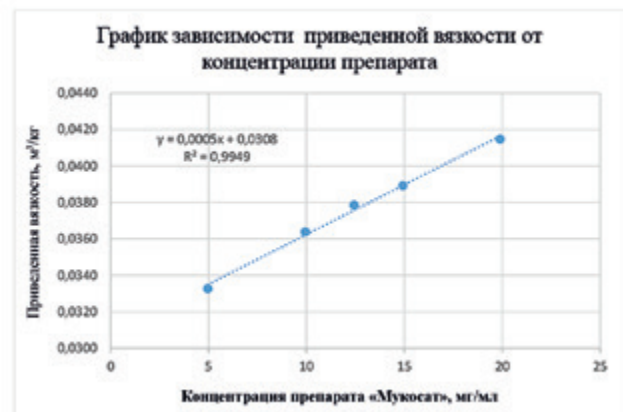


Рисунок 2. График зависимости приведенной вязкости (м<sup>3</sup>/кг) от концентрации препарата «Мукосат» (мг/мл)

Характеристической вязкостью является величина свободного коэффициента уравнения прямолинейной зависимости приведенной вязкости от концентрации препарата. Характеристическая вязкость исследуемого препарата «Мукосат» равна 0,0308 м<sup>3</sup>/кг.

Результаты расчета среднего времени истечения испытуемых растворов препарата «Хондрогард» и рассчитанные значения приведенной вязкости представлены в таблице 4.

На основании вышеприведенных результатов был получен график зависимости приведенной вязкости от концентрации препарата «Хондрогард», который представлен на рисунке 3.

Характеристической вязкостью является величина свободного коэффициента уравнения прямо-



линейной зависимости приведенной вязкости от концентрации препарата. Характеристическая вязкость исследуемого препарата «Хондрогард» равна 0,0331 м<sup>3</sup>/кг.

Таблица 4.

Результаты расчета приведенной вязкости препарата «Хондрогард»

Препарата «Хондрогард» раствор для внутримышечного введения 100 мг/мл					
Испытуемый раствор	1	2	3	4	5
Концентрация, мг/мл	19,8	14,85	12,375	9,9	4,95
Среднее время истечение	142,47	122,73	113,97	105,17	89,87
Вязкость приведенная, м <sup>3</sup> /кг	0,0438	0,0409	0,0398	0,0382	0,0357

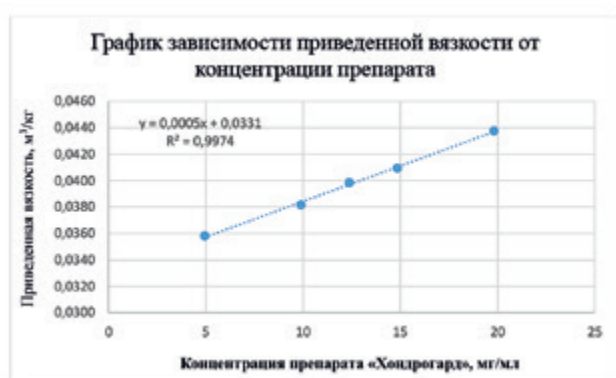


Рисунок 3. График зависимости приведенной вязкости от концентрации (мг/мл) для препарата «Хондрогард»

Результаты расчета среднего времени истечения испытуемых растворов препарата «Драстоп» и рассчитанные значения приведенной вязкости представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Результаты расчета приведенной вязкости препарата «Драстоп»

Препарата «Драстоп» раствор для внутримышечного введения 100 мг/мл					
Испытуемый раствор	1	2	3	4	5
Концентрация, мг/мл	18,62	13,965	11,638	9,310	4,655
Среднее время истечение	145,47	126,30	116,87	108,27	91,63
Вязкость приведенная, м <sup>3</sup> /кг	0,0486	0,0469	0,0456	0,0449	0,0431

На основании вышеприведенных результатов был получен график зависимости приведенной вязкости от концентрации препарата «Драстоп», который представлен на рисунке 4.

Характеристической вязкостью является величина свободного коэффициента уравнения прямой зависимости приведенной вязкости от

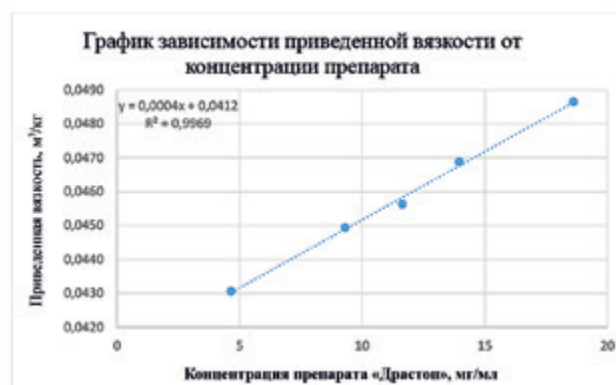


Рисунок 4. График зависимости приведенной вязкости от концентрации (мг/мл) для препарата «Драстоп»

концентрации препарата. Характеристическая вязкость исследуемого препарата «Драстоп» равна 0,0412 м<sup>3</sup>/кг.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования была доказана возможность определения характеристической вязкости для инъекционных препаратов на основе хондроитина сульфата для внутримышечного введения. Была доказана возможность применения 0,2 М раствора натрия хлорида в качестве растворителя для устранения полиэлектролитного набухания, которое исключает возможность определения характеристической вязкости водных растворов препарата. Была получена прямолинейная зависимость приведенной вязкости от концентрации лекарственного препарата в концентрационных диапазонах от 4,5 до 20 мг/мл с использованием в качестве растворителя раствора натрия хлорида.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е.С. Северин. Биохимия: Учебник / Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2003. 779 с.
2. Европейская Фармакопея 8.0. URL: [http://www.fptl.ru/biblioteka/farmakopei/evropeyskaya-farmakopeya\\_8\\_vol-2.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/farmakopei/evropeyskaya-farmakopeya_8_vol-2.pdf) (дата обращения 10.10.2017).
3. Т.Н. Шкарина. Анализ и стандартизация хондроитина сульфата натрия: автореф. дис. ... к.фарм.н. – М.: НЦЭСМП, 2009.
4. Патент РФ 2612014. Средство для лечения артрологических заболеваний / В.Н. Шестаков, Л.В. Персанова, К.Р. Савельева, Т.Ю. Андреевичева. – Бюл. № 7, 2017.
5. О.В. Борисов, Е.Б. Жулина, А.А. Полоцкий, А.А. Даринский, И.М. Неелов. Основы физики макромолекул: Учебное пособие. – СПб: Университет ИТМО, 2015. 74 с.
6. А.Д. Антипина. Методические разработки к практическим работам по полиэлектролитам: Учебное пособие. – М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1988. – 56.
7. ОФС.1.2.1.0015.15. Вязкость // Государственная фармакопея РФ. XIII изд.