

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПІРОКАТЕХІНУ ТА ЕЛАГОВОЇ КИСЛОТИ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ

Н.Ю. Бондаренко

Національний фармацевтичний університет (Харків)

Вступ

Поліфенольні сполуки рослинного походження такі, як пірокатехін (*ПК*) та елагова кислота (*ЕК*), належать до дубильних речовин гідролізованої групи, виявляють різнобічну фармакологічну дію, а саме: антиоксидантну, протизапальну, антибактеріальну, кардіопротекторну, противиразкову та ін. [7]. Антиоксидантну дію *ПК* та *ЕК* зумовлює їх хімічна структура. Завдяки наявності в молекулі рухливих атомів водню, поліфенольні сполуки нейтралізують вільні радикали, утворюючи відносно стійкі семіхінони [5]. Зазначені фармакологічні властивості *ЕК* можна пояснити особливостями її хімічної структури – наявністю великої кількості ОН - груп, які здатні зв'язувати вільні радикали з утворенням семіхінонних комплексів, відновлювати вільні йони феруму і, таким чином, стабілізувати процес перекисного окиснення ліпідів [1].

На теперішній час у науковій літературі описані методики кількісного визначення *ПК* та *ЕК* за допомогою різних методів. В основному, кількісне визначення *ПК* та *ЕК* проводять за допомогою метода ВЕРХ [3, 8, 10], методом спектрофотометрії в УФ-ділянці спектра [9, 11, 13], а також іншими хімічними і фізико-хімічними методами кількісного аналізу [2, 4, 6, 12, 14, 15].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дослідження проведено у відповідності з планом науково-дослідницьких робіт Національного фармацевтичного університету «Хімічний синтез, виділення та аналіз нових фармакологічно-активних речовин, встановлення зв'язку «структура – дія», створення нових лікарських препаратів» (№ держреєстрації 198U007011).

Мета – порівняльне вивчення антиоксидантних властивостей **ПК** та **ЕК** за ефектом інгібування хемілюмінесценції (**ХЛ**) аналітичної системи $H_2L - H_2O_2 - Hb$.

Матеріали та методи дослідження

Для досліджень використовували субстанції пірокатехіну та кислоти елагової фармакопейної чистоти.

Вихідний 0,001 моль/л розчин люмінолу (H_2L) виготовляли з очищеного комерційного препарату кваліфікації ч.д.а. (НПФ «Синбіас», ТУ 6-09-08-973) перекристалізацією з льодової оцтової кислоти в присутності активованого вугілля, а відтак – з насиченого розчину лугу за точною наважкою у 0,01 моль/л розчині натрій гідроксиду.

Для створення та підтримки необхідної кислотності середовища використовували 0,1 моль/л розчин натрій гідроксиду; значення величини рН розчинів контролювали за допомогою лабораторного потенціометра „Іономер И-130” зі скляним електродом ЭСЛ-43-07 в парі з аргентумхлоридним (ЭВЛ-1), заповненим насиченим розчином калій хлориду.

Розчин гідроген пероксиду (H_2O_2) 5% концентрації готували із 50% препарату о.с.ч. (Чехія) відповідним розбавленням двічі дистильованою водою з наступним контролем вмісту гідроген пероксиду перманганатометрично.

Вихідний розчин гемоглобіну (Hb) з концентрацією 75 мкг/мл готували розчиненням 7,5 мг гемоглобіну виробництва фірми “Simko Ltd” (Україна) у 75 мл 0,7% розчину натрію дигідрогенфосфату при нагріванні до 313...323 К. Об’єм доводили до 100 мл двічі дистильованою водою при 293 К і перемішували. Робочий розчин гемоглобіну готували розбавленням вихідного двічі дистильованою водою точно в 100 разів. Розчин придатний до застосування протягом доби.

Виготовлення стандартного розчину (РСЗ) пірокатехіну (ПК) $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Розчиняли 0,1100 г субстанції пірокатехіну (точна наважка) у мірній колбі на 100 мл у 75 мл двічі дистильованої воді. Об’єм розчину доводили до позначки двічі дистильованою водою при 293 К. Розчин придатний до

застосування протягом доби. Розчини з меншою концентрацією пірокатехіну готували з основного стандартного розчину відповідним розбавленням двічі дистильованою водою.

Виготовлення стандартного розчину елагової кислоти (ЕК) $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Розчиняли 0,0302 г субстанції елагової кислоти (точна наважка) у мірній колбі на 100 мл у 50 мл двічі дистильованої води з додаванням 10 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду. Розчин придатний до застосування протягом доби. Розчини з меншою концентрацією елагової кислоти готували з основного стандартного розчину відповідним розбавленням двічі дистильованою водою.

Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали в умовних одиницях (у.о.) на установці з фотоелектронним помножувачем ФЭУ-84-А, вимірювачем малих струмів ИМТ-0.5 і швидкодіючим (постійна часу 0.1с) потенціометром-самописцем. Реакцію, що супроводжується хемілюмінесценцією, проводили у кварцовій кюветі циліндричної форми діаметром 30 мм з робочим об'ємом 10 мл. При проведенні дослідів зберігали наступний порядок змішування реагентів: до суміші індикатора люмінолу в розчині лугу та гідроген пероксиду в присутності або у відсутності **ПК** або **ЕК** додавали за допомогою піпеткового дозувача П-1 0,50 мл розчину *Hb* і неперервно реєстрували кінетичну криву інтенсивність хемілюмінесценції ($I_{\text{хл}}$) - час (*xв*). Дозувач влаштований у зйомний тримач, який ізолює фотокатод фотоелектронного помножувача від стороннього світла, а відтак дозволяє працювати при звичайному освітленні. Усі досліді виконували при температурі 290...293 К.

Отримані результати та обговорення

У результаті проведених досліджень було встановлено, що оптимальним для інгібування *ХЛ* в системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ є порядок змішування, коли останнім додається розчин *Hb*. Оптимальними концентраціями реактивів для **ПК** та **ЕК** є: $c(H_2L) = (1 - 2) \cdot 10^{-4}$ моль/л, $c(NaOH) = 0,05$ моль/л, $c(H_2O_2) = 0,0375$ моль/л, $C(Hb) = 3,75 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл.

Методика кількісного визначення ПК в модельних водних розчинах. У кварцову кювету послідовно приливали 2 мл $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину H_2L , 5 мл

0,1 моль/л розчину натрію гідроксиду, 1,75 мл двічі дистильованої води, 0,25 мл 5%-вого розчину H_2O_2 та 0,5 мл 0,1 мг/мл розчину **ПК**. Одержану суміш перемішували і встановлювали кювету у світлозахисну камеру фотометра. Відкривали шторку і вливали за допомогою піпеткового дозувача 0,5 мл розчину **Нв**. Аналогічного порядку додавання розчинів дотримувались при виконанні досліду з розчином **РСЗ**. У всіх випадках реєстрували максимальне значення інтенсивності світіння у порівнянні до його значення у холостому досліді, $\Delta I_{xл} = I_0 - I_{xл}$ (де ΔI_0 – максимальна інтенсивність хемілюмінесценції у холостому (контрольному) досліді, у.о.). Вміст **ПК** у розчині знаходили методом порівняння $\Delta I_{xл}$ з розчином **РСЗ**.

Вміст **ПК** розраховували за формулою:

$$X = \frac{C_{cm} \cdot \Delta I_{xл}}{\Delta I_{cm}},$$

де C_{cm} – концентрація розчину порівняння **РСЗ ПК**, моль/л;

ΔI_{cm} – зменшення максимальної інтенсивності **ХЛ** у досліді з розчином **РСЗ ПК**, у.о.;

$\Delta I_{xл}$ – зменшення максимальної інтенсивності **ХЛ** у досліді з розчином досліджуваного зразка **ПК**, у.о.;

На рис. 1 наведена залежність $I_0/I_{xл}$ від концентрації **ПК**, а на рис. 2 - залежність $I_0/I_{xл}$ від концентрації **ЕК** у системі $H_2L - H_2O_2 - Нв$ в логарифмічних координатах, де $I_{xл}$ та I_0 – максимальні інтенсивності хемілюмінесценції в присутності та за відсутності інгібітора відповідно. Як видно з наведених даних, кутовий коефіцієнт градуовальної залежності для **ЕК** перевищує такий коефіцієнт градуовальної залежності для **ПК** майже на порядок. Це свідчить про значно вищу чутливість методики хемілюмінесцентного визначення **ЕК** за опрацьованою методикою.

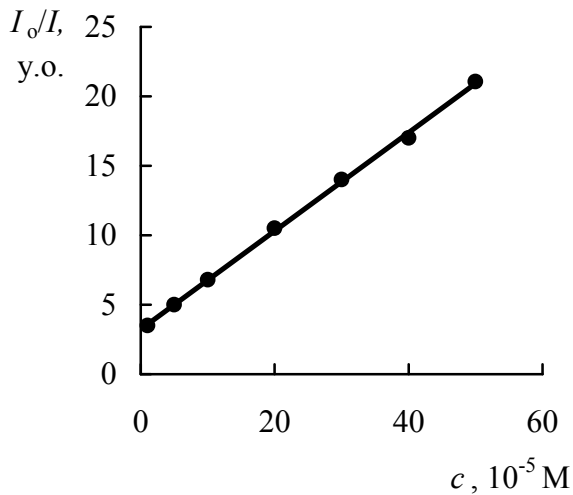


Рис. 1. Концентраційна залежність $I_0/I_{\text{хл}}$ у системі $H_2L - H_2O_2 - PK - Hb$.

$$I_0/I_{\text{хл}} = 0,3536 \cdot 10^5 c + 3,245$$

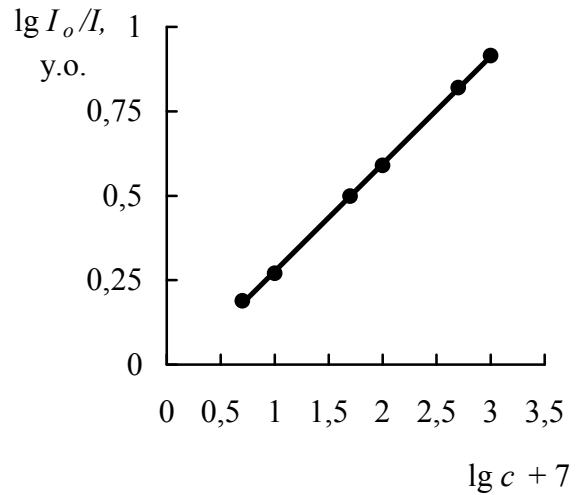


Рис. 2. Залежність $\lg I_0/I_{\text{хл}}$ від концентрації EK в системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$.

$$\lg I_0/I_{\text{хл}} = 0,3183 \cdot (\lg c + 7) - 0,0416$$

Методика кількісного визначення EK в модельних водних розчинах. У кварцову кювету послідовно приливали 1 мл $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину H_2L , 5 мл 0,1 моль/л розчин натрію гідроксиду, 2,75 мл двічі дистильованої води, 0,25 мл 5%-вого розчину H_2O_2 та 0,5 мл розчину EK . Далі виконували аналіз, як при визначенні вмісту PK . Вміст кислоти елагової розраховували за формулою:

$$X = \frac{C_{\text{ст}} \cdot \Delta I_{\text{хл}}}{\Delta I_{\text{ст}}}$$

де $C_{\text{ст}}$ – концентрація розчину порівняння PK EK , моль/л;

$\Delta I_{\text{ст}}$ – зменшення максимальної інтенсивності XL у досліді з розчином PK EK , у.о.;

$\Delta I_{\text{хл}}$ – зменшення максимальної інтенсивності XL у досліді з розчином досліджуваного зразка кислоти елагової, у.о.;

Результати кількісного визначення PK та EK в модельних розчинах субстанції наведені в табл.1.

**Результати кількісного визначення пірокатехіну та кислоти елагової
хемілюмінесцентним методом ($n = 5, P = 0,95$)**

Уведено речовини, моль/л	Знайдено речовини, моль/л	Метрологічні характеристики
пірокатехіну $10,00 \cdot 10^{-4}$	$9,94 \cdot 10^{-4}$ $1,00 \cdot 10^{-3}$ $9,99 \cdot 10^{-4}$ $1,00 \cdot 10^{-3}$ $9,97 \cdot 10^{-4}$	$\bar{X} = 9,98 \cdot 10^{-4}$ $S = \pm 2,5 \cdot 10^{-6}$ $S_{\bar{X}} = \pm 1,1 \cdot 10^{-6}$ $\Delta \bar{X} = \pm 3,2 \cdot 10^{-6}$ RSD= $\pm 0,25$ % $\delta = -0,2$ %
елагової кислоти $10,0 \cdot 10^{-5}$	$1,01 \cdot 10^{-4}$ $9,91 \cdot 10^{-5}$ $1,01 \cdot 10^{-4}$ $1,00 \cdot 10^{-4}$ $9,99 \cdot 10^{-5}$	$\bar{X} = 1,00 \cdot 10^{-4}$ $S = \pm 8,1 \cdot 10^{-7}$ $S_{\bar{X}} = \pm 3,6 \cdot 10^{-7}$ $\Delta \bar{X} = \pm 1,0 \cdot 10^{-6}$ RSD= $\pm 0,8$ % $\delta = 0$ %

Отже, як результат дослідження, нами розроблені нові методики здійснення кількісного визначення **ПК** та **ЕК** в модельних розчинах субстанції методом хемілюмінесценції за ефектом інгібування люмінолової реакції. Відносне стандартне відхилення не перевищує $\pm 0,8$ % при правильності $\delta = -0,2$ %...0 %. Нижня межа визначуваних концентрацій **ПК** та **ЕК**, c_H становить відповідно $1,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л та $4 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Висновки

1. У порівняльному аспекті вивчений інгібіторний вплив **ПК** та **ЕК** на хемілюмінесцентну реакцію окиснення люмінолу гідроген пероксидом в присутності *Hb*: **ЕК** виявляє сильнішу інгібуючу активність.

2. Запропонована методика здійснення кількісного визначення вмісту **ПК** та **ЕК** в модельних розчинах субстанції кінетичним методом інгібування *ХЛ* системи $H_2L - H_2O_2 - Hb$. При визначенні **ПК** та **ЕК** у модельних розчинах субстанції $RSD = 0,8\%$ ($n = 5$, $P = 0,95$), нижня межа визначуваних концентрацій **ПК** та **ЕК**, c_n , становить $1,2 \cdot 10^{-6}$ М та $4 \cdot 10^{-8}$ моль/л відповідно.

Література:

1. Малиновська С. А. Порівняльне вивчення фізико-хімічних властивостей елагової кислоти та альтану / С. А. Малиновська, Є. В. Гладух, О. І. Зайцев // Фармац. журнал. – 2005. - № 2. – С. 80–82.
2. Пат. 2205398 Россия. Способ определения гидрохинона и пирокатехина в водных растворах; МПК 7G 01 N 30/02 / Л. А. Харитоновна, Я. И. Коренман, О. Б. Рудаков. - № 20011356 96/28; Заявл. 24.12.2001; Опубл. 27.05.2003.
3. Пеннер Н. А. Применение сверхсшитого полистирола для определения пирокатехина, резорцина и гидрохинона методом ОФ ВЭЖХ с предварительным динамическим концентрированием на потоке / Н. А. Пеннер, П. Н. Нестеренко, М. А. Рыбалко // Журн. анал. химии. – 2001. – Т. 56, № 10. – С. 1067–1072.
4. Подолина Е. А. Электроаналитическое определение п-крезола и пирокатехина в водах / Е. А. Подолина, Л. А. Харитоновна, Я. И. Коренман // Вестн. Воронеж. гос. технол. акад. – 2000. – № 3. – С. 165–166.
5. Сербин А. Г. Альтан – новое отечественное эффективное средство ранозаживляющего, противовоспалительного, антимикробного действия / А. Г. Сербин, Л. В. Яковлева, О. П. Хворост // Провизор. – 1998. - № 18. – С. 40–41.
6. Харитоновна Л. А. Экстракционно-кондуктометрическое определение пирокатехина в сточных водах / Л. А. Харитоновна // Материалы 41 Отчетной научной конференции за 2002 г.: тез. доп. - Воронеж, 2002. – С. 183.
7. Яковлева Л. В. Защитное действие элаговой кислоты при экспериментальном миокардите / Л. В. Яковлева, А. К. Ивахненко, Н. Д. Бунятян // Эксперим. и клин. фармакология. – 1998. – Т. 61, № 3. – С. 32–34.

8. Hao Xue-Zhi. Определение содержания пирокатехина в соединениях, экстрагируемых из корней red sage astraolus методом ВЭЖХ / Hao Xue-Zhi, Liu Chen, Wang Xin-yan // Harbin Univ. Commer. Natur. Sci. Ed. – 2002. – V. 18, № 3. – P. 253–254.
9. Bala I. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies / I. Bala, V. Bhardwaj, S. Hariharan et al. // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2006. – Vol. 40. – P. 206-210.
10. Li Zhong. Определение фенола и пирокатехина в табачных листьях твердофазной экстракцией и ВЭЖХ / Li Zhong, Wang Lan, Yang Guangyu // Anal. Chem. – 2001. – Vol. 29, № 12. – P. 1409–1411.
11. Liu Jianhua. Одновременное определение фенола, катехина и хинола в смесях методом спектрофотометрии с двойным фильтрованием посредством преобразования Фурье и использованием второй производной отношения спектров / Liu Jianhua, Lin Zhenyu // Spectrosc. and Spectral Anal. – 2000. – Vol. 20, № 4. – P. 480–483.
12. Sun Wei. Application of carbon ionic liquid electrode for the electrooxidative determination of catechol / Sun Wei, Li Yinzhao, Yang Maoxia et al. // Sens. and Actuators. B. – 2008. – Vol. 133, № 2. – P. 387-392.
13. Wilson C. Thomas. Quantitative determination of ellagic acid / Thomas C. Wilson, Ann E. Hagerman // J. Agric. Food Chem. - 1990. – Vol. 38. – P. 1678-1683.
14. Wang Liang. Covalent modification of glassy carbon electrode with aspartic acid for simultaneous determination of hydroquinone and catechol / Wang Liang, Huang Peng-fei, Wang Hong-jing et al. // Ann. chim. – 2007. – Vol. 97, № 5-6. – P. 295-404.
15. Yang Shaoming. Horseradish peroxidase biosensor based on layer technique for the determination of phenolic compounds / Yang Shaoming, Li Yangmei, Jiang Xiuming et al. // Sens. and Actuators. B. – 2006. – Vol. 114, № 2. – P. 774–780.

Резюме

Бондаренко Н. Ю. *Кількісне визначення пірокатехіну та елагової кислоти хемілюмінесцентним методом.*

Стаття присвячена порівняльному вивченню інгібіторного впливу пірокатехіну (**ПК**) та елагової кислоти (**ЕК**) на хемілюмінесцентну реакцію окиснення люмінолу гідроген пероксидом в присутності *Hb*. З'ясовано умови та розроблена методика кількісного визначення вмісту **ПК** та **ЕК** в модельних розчинах субстанції кінетичним методом інгібування хемілюмінесценції. При визначенні **ПК** та **ЕК** у модельних розчинах субстанції $RSD = 0,8\%$ ($n = 5$, $P = 0,95$), нижня межа визначуваних концентрацій **ПК** та **ЕК** c_n становить $1,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л та $4 \cdot 10^{-8}$ моль/л відповідно.

Ключові слова: люмінол, гемоглобін, пірокатехін, кислота елагова, хемілюмінесцентний метод.

Резюме

Бондаренко Н. Ю. *Кількісне визначення пірокатехіну та елагової кислоти хемілюмінесцентним методом.*

Стаття посвящена сравнительному изучению ингибиторного влияния пирокатехина и эллаговой кислоты на хемилуминесцентную реакцию окисления люминола пероксидом водорода в присутствии *Hb*. Выяснены условия и разработана методика количественного определения содержания пирокатехина и эллаговой кислоты в модельных растворах субстанции кинетическим методом ингибирования хемилуминесценции. При определении пирокатехина и эллаговой кислоты в модельных растворах субстанции $RSD = 0,8\%$ ($n = 5$, $P = 0,95$), нижняя граница определяемых концентраций пирокатехина и эллаговой кислоты, c_n , составляет $1,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л та $4 \cdot 10^{-8}$ моль/л соответственно.

Ключові слова: люминол, гемоглобин, пирокатехин, кислота эллаговая, хемилуминесцентный метод.

Summary

Bondarenko N. Yu. Quantitative determination of pyrocatechol and ellagic acid by chemiluminescence method.

Key words:, luminol, haemoglobin, pyrocatechol and ellagic acid chemiluminescence method.

The article is devoted to the comparative study of inhibition influence of the pyrocatechol and ellagic acid on the chemiluminescent reaction of luminol oxidation by hydrogen peroxide in the presence of haemoglobin (Hb). Terms are found and methodology of quantitative determination of the pyrocatechol and ellagic acid content in model solutions of substance by the kinetic method of inhibition of chemiluminescence is developed. At determination of the pyrocatechol and ellagic acid in model solutions of substance of RSD = 0,8 % ($n = 5$, $P = 0,95$), LOG of the pyrocatechol and ellagic acid is $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol/l and $4 \cdot 10^{-8}$ mol/l accordingly.