УДК 615.25:54.062

Н.Ю.Бондаренко к.ф.н., доц., М.Є.Блажеєвський д.х.н., проф.

Національний фармацевтичний університет

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДИПІРИДАМОЛУ МЕТОДОМ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ

ключові слова: хемілюмінесценція, дипіридамол, гемін

Дипіридамол (*курантил*) (2,2′,2″,2‴-[[4,8-ди (піперидин-1-іл) піримідин-2,6-дііл] динітрило] тетраетанол) (***Д***) за хімічною будовою належить до конденсованих похідних піримідину і знаходить широке застосування в медичній практиці як антиангінальний та антиагрегантний засіб для лікування серцево-судинних захворювань. Його продукують у вигляді субстанцій солей гідрохлориду та сульфату, а також готових лікарських форм (таблетки, капсули та розчин для ін'єкцій).

Для кількісного визначення вмісту основної речовини у субстанції ***Д*** BPh (2009) рекомендує використовувати метод ацидиметричного потенціометричного титрування в середовищі метанолу, а в таблетках - метод прямої УФ СФМ у середовищі хлоридної кислоти при 283 нм [2]. У науковій літературі також описані методики кількісного визначення препарату методами флуориметрії [7], вольтамперометрії [4], потенціометрії з використанням ІСЕ [5], а також ВЕРХ [9, 10] та ТШХ [1]. Крім того, відомі методики високочутливого кінетичного визначення ***Д*** з використанням хемілюмінесцентної (ХЛ) системи люмінол (H_2L) – калій гексаціаноферат (III) з C_{min} = 3 нг/мл (*RSD* = 2,7% при визначенні 100 нг/мл) [6] та потоково-ін'єкційного ХЛ визначення ***Д***, заснованого на посиленні ХЛ реакції в системі ***Д*** – калій перманганат в присутності родаміну В як сенсибілізатора в організованому середовищі Tween-80, C_{min} = 17 нг/мл, *RSD* = 1,1% (*n* = 11) [8].

Для кількісного визначення ***Д*** у лікарських препаратах методом ХЛ нами запропонована нова аналітична система H_2L - гідроген пероксид (H_2O_2) - гемін (*Hem*) – (***Д***), в якій препарат є інгібітором виникаючої ХЛ. Виникаючий у ХЛ системі оксо-ферум (IV) порфірин катіон-радикал Por-Fe(IV)$^{+}$·=O діє як

активний окисник H_2L, що призводить до посилення ХЛ. Інгібіторна дія ***Д*** полягає, ймовірно, у конкурентній взаємодії як з Por-Fe(IV)$^{+}$·=O, так і активними формами оксигену, що відповідальні за виникнення випромінювача у ХЛ реакції.

Експериментальна частина

Для досліджень використовували субстанцію дипіридамолу фармакопейної чистоти, лікарські форми, що містять дипіридамол: дипіридамол таблетки виробництва ТОВ „ДЗ ДНЦЛЗ" (Україна) складу: дипіридамолу 25 мг, серія 30809 та розчин дипіридамолу 5 мг/мл - 2 мл для ін'єкцій виробництва ТОВ „ДЗ ДНЦЛЗ" (Україна), серія 50809.

Вихідний 0,001 М розчин люмінолу (H_2L) готували з очищеного комерційного препарату кваліфікації х.ч. виробництва фірми „Хемапол" (Чехія) перекристалізацією з льодової кислоти ацетатної в присутності активованого вугілля, а відтак – з насиченого розчину лугу за точною наважкою у 0,01 М розчині натрій гідроксиду. В роботі використовували розчини лугу без карбонатів.

Для створення та підтримки необхідної кислотності середовища використовували 0,1 М розчин натрій гідроксиду, величину pH розчинів контролювали за допомогою лабораторного потенціометра „Иономер И-130" зі скляним електродом ЭСЛ-43-07 в парі з хлоридосрібним (ЭВЛ-1), заповненим насиченим розчином калій хлориду.

Розчин гідроген пероксиду (H_2O_2) 5% концентрації готували із 50% препарату о.с.ч. розбавленням його двічі дистильованою водою з наступним контролем вмісту гідроген пероксиду перманганатометрично [2].

Вихідний розчин геміну (*Hem*) 0,1 мг/мл виробництва фірми «Fluka» готували розчиненням 10 мг геміну у 75 мл 0,5% розчину калію гідрофосфату при нагріванні до 323 К. Об'єм доводили до 100 мл двічі дистильованою водою при 293 К і перемішували. Робочий розчин з концентрацією геміну 1,0 мкг/мл готували розбавленням вихідного розчину двічі дистильованою водою. Розчин придатний до використання протягом доби.

Приготування стандартного розчину (*РСЗ*) дипіридамолу (***Д***) $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Розчиняли 0,0252 г субстанції дипіридамолу у мірній колбі на 50 мл у 25 мл метанолу х.ч. Об'єм розчину доводили до позначки при 293 К. Розчин придатний до застосування протягом тижня при зберіганні у темному місці. Розчини з меншою концентрацією дипіридамолу готували з основного стандартного розчину відповідним розбавленням метанолом.

Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали на Хемілюмінометрі – 0,1 з фотоелектронним помножувачем ФЭУ-84-А, вимірювачем малих струмів ИМТ-0,5 і швидкодіючим потенціометром-самописцем "LINE RECORDER TZ 4620" виробництва "Laboratorni přistroje" (Чехія). Використовували кварцову кювету циліндричної форми діаметром 30 мм з робочим об'ємом 10 мл. При проведенні дослідів зберігали такий порядок змішування реагентів: до суміші розчину люмінолу та гідроген пероксиду (з розчином інгібітора або без нього) додавали за допомогою піпеточного дозувача П-1 0,50 мл розчину гемоглобіну *Hb* і реєстрували кінетичну криву: інтенсивність хемілюмінесценції ($I_{хл}$) - час (*хв*). Дозувач влаштований у зйомний тримач, який ізолює фотокатод фотоелектронного помножувача від стороннього світла, а відтак дозволяє працювати при звичайному освітленні. Усі досліди виконували при температурі 291...293 К.

Результати та їх обговорення

Вивчали вплив порядку змішування розчинів H_2L, натрій гідроксиду, H_2O_2, ***Д*** і *Нет* та їх концентрацій на інтенсивність виникаючої ХЛ.

Оптимальними концентраціями реактивів у даній ХЛ системі є: $c(NaOH)$ = 0,06 моль/л, $c(H_2O_2)$ = 0,125%, $c(H_2L) = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C(Нет) = 5 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл. У результаті проведених досліджень було встановлено, що оптимальним є порядок змішування, коли останнім додається розчин *Нет*.

На рис. 1 наведена залежність часу, за який спостерігається зниження інтенсивності виникаючої хемілюмінесценції в досліджуваній аналітичній системі на 80% від максимальної величини, отриманої в холостому досліді, у хвилинах, від концентрації ***Д***. Кінетична крива виникнення ХЛ за відсутності

інгібітора нагадувала короткочасний спалах з подальшим згасанням ХЛ за експоненціальним законом впродовж декількох хвилин. При додаванні інгібітора максимальна інтенсивність хемілюмінесценції, I_{max}, залишалась практично сталою в інтервалі концентрацій 10^{-7} – 10^{-5} моль/л, тоді як швидкість згасання ХЛ різко зростала. За аналітичний сигнал нами було обрано величину, яка являє собою різницю між часом зниження $I_{хл}$ на 80% від максимальної початкової величини (у холостому досліді) та таким зниженням $I_{хл}$ у робочому досліді в присутності інгібітора (Δτ, хв). Як градуювальну використовували лінійну залежність Δτ (хв) від концентрації ***Д*** (моль/л). Рівняння градуювального графіка має вигляд $\Delta\tau = 0{,}21 \cdot 10^6 c + 0{,}02$, $r = 0{,}99$, де c – концентрація інгібітора, моль/л.

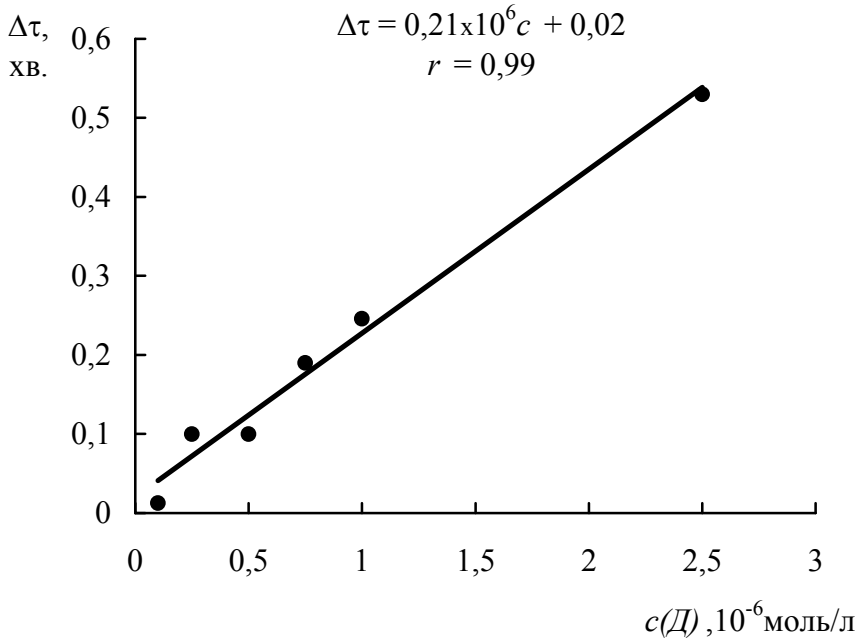

Рис. 1. Залежність часу, за який спостерігається зниження інтенсивності хемілюмінесценції в системі H_2L – H_2O_2 – (*Нет*) - *(Д)* на 80%, від концентрації ***Д***. $c(NaOH)$ = 0,06 моль/л, $c(H_2O_2)$ = 0,125%, $c(H_2L) = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C(Нет) = 5 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл

Методика кількісного визначення дипіридамолу у модельних метанольних розчинах. В кварцову кювету послідовно приливають 1,00 мл розчину H_2L, 3,00 мл 0,195 моль/л натрію гідроксиду, (10 – х) двічі дистильованої води, де х – загальний об’єм всіх використовуваних реактивів,

0,25 мл 5%-го розчину H_2O_2 і випробуваний розчин дипіридамолу (РСЗ або модельний розчин). Отриману суміш перемішують і встановлюють кювету у світлозахисну камеру фотометра. Відкриють шторку і вливають за допомогою піпеткового дозувача 0,5 мл розчину *Нет*. У всіх випадках реєструють час, за який спостерігається зниження інтенсивності виникаючої хемілюмінесценції на 80% (ум.од.) від початковоїмаксимальної величини, отриманої в холостому досліді. Дані представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати кількісного визначення дипіридамолу у модельних розчинах (n = 5, P = 0,95)

Уведено препарату, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	Метрологічні характеристики
0,126	0,124 0,136 0,124 0,115 0,132	$\bar{x}$ = 0,126 S = 8,1·10^{-3} $S_{\bar{x}}$ = 3,6·10^{-3} $\Delta\bar{x}$ = 1,0·10^{-2} RSD = 6,45 %
0,252	0,252 0,250 0,247 0,267 0,244	$\bar{x}$ = 0,252 S = 8,9·10^{-3} $S_{\bar{x}}$ = 4,0·10^{-3} $\Delta\bar{x}$ = 1,1·10^{-2} RSD = 3,50 %
0,378	0,390 0,375 0,382 0,368 0,373	$\bar{x}$ = 0,378 S = 8,7·10^{-3} $S_{\bar{x}}$ = 3,9·10^{-3} $\Delta\bar{x}$ =1,1·10^{-2} RSD = 2,30 %

Методика кількісного визначення дипіридамолу у таблетках по 25 мг. Біля 380 мг розтертих таблеток (точна наважка), розчиняють у мірній колбі місткістю 100 мл у метанолі і доводять об'єм до позначки при 20°С. 10,00 мл отриманого розчину вносять у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять об'єм до позначки двічі дистильованою водою. Паралельно готують об'ємно-ваговим методом стандартний розчин ***Д*** з концентрацією 50,0 мкг/мл. У кварцову кювету послідовно приливають 1,00 мл 1·10^{-3} М розчину H_2L, 3,00 мл 0,195 М розчину натрій гідроксиду, (10 - х) мл двічі дистильованої води, 0,25 мл 5%-ного розчину H_2O_2, 0,50 мл розчину таблеток ***Д***. Одержану суміш перемішують

і встановлюють кювету у світлозахисну камеру. Відкривають шторку, вливають за допомогою піпеткового дозувача 0,5 мл розчину *Нет* і реєструють на самописці зміну інтенсивності ХЛ залежно від часу. Аналогічного порядку додавання розчинів дотримуються при виконанні досліду з розчином *РСЗ*. Вміст ***Д*** в препараті знаходять методом порівняння $\Delta\tau$ розчину препарату з розчином *РСЗ*.

Вміст ***Д*** в г на таблетку (X) розраховують за формулою:

$$X = \frac{\Delta\tau_1 \cdot c_0 \cdot \overline{m}}{\Delta\tau_0 \cdot m_н}$$

де c_1 – початкова концентрація ***Д***, г/мл;

$\overline{m}$ – середня маса таблетки (n = 20), г;

$m_н$ – маса наважки розтертих таблеток однієї серії, г;

Методика кількісного визначення дипіридамолу у розчині для ін'єкцій 5 **мг/мл - 2 мл.** 1,00 мл досліджуваного ін'єкційного розчину ***Д*** вносять у мірну колбу місткістю 1 л і доводять об'єм до позначки двічі дистильованою водою при 20°С. Паралельно готують об'ємно-ваговим методом розчин робочого стандартного зразка ***Д*** з концентрацією 5,0 мкг/мл. Далі виконують аналіз, як при визначенні вмісту ***Д*** в таблетках. Результати виражають кількістю грамів ***Д*** в 1 мл препарата (див. табл. 2).

Таблиця 2

Результати кількісного визначення дипіридамолу в лікарських формах (*n* = 5, P = 0,95)

Лікарська форма, вміст дипіридамолу	Знайдено ***Д***, мг	Метрологічні характеристики
Таблетки дипіридамолу по 25 мг 24,15 мг*	24,44 24,44 25,00 25,00 23,80	$\overline{X}$ = 24,54 S = ± 0,498 $S_{\overline{X}}$ = ± 0,223 $\Delta\overline{X}$ = ± 0,62 RSD = ± 2,03% δ= + 1,60%

Розчин дипіридамолу 5 мг/мл – 2 мл 4,78 мг/мл *	4,93 4,76 4,59 4,85 4,9	$\overline{X} = 4{,}81$ $S = \pm 0{,}14$ $S_{\overline{X}} = \pm 0{,}06$ $\Delta\overline{X} = \pm 0{,}17$ $RSD = \pm 2{,}85\%$ $\delta = +0{,}54\%$

Примітка.*Вміст дипіридамолу встановлений за методикою BPh (2009) [3]

Висновки:

1. Вперше вивчений інгібіторний вплив дипіридамолу на хемілюмінесцентну реакцію окиснення люмінолу гідроген пероксидом у лужному середовищі в присутності геміну як каталізатора.

2. Опрацьовані методики кількісного визначення дипіридамолу у субстанції, модельних метанольних розчинах та лікарських формах методом хемілюмінесценції ($RSD \leq 2{,}85\%$, $\delta \leq +1{,}60\%$)

Література:

1. Степанова Э.Ф., Куль И.Я., Глижова Т.Н., Саенко А.Ю. // Науч. обозрение. - 2009. - № 1. - С. 13 - 15.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
3. British Pharmacopoeia. London: The Stationery Office. – 2009. - V. 1,2. – 6481 P.
4. De Toledo Renata Alves, Castilho Marilza, Mazo Luiz Henrique // J. Pharm. and Biomed. Anal. - 2005. – V.36, № 5. - P. 1113 - 1117.
5. Li Dong-hui, Ding Yang-dong, Wang Min et al. // J. Shenyang Pharm. Univ. - 2003. – V. 20, № 4. - P. 280 – 287.
6. Liu Qing-Hui, Lü Jiu-Ru, Feng Na // Chem. J. Chin. Univ. - 2006. – V. 27, № 6. – P. 1036 - 1041.
7. Oshrine B., Malinin A., Pokov A. et al. // Meth. and Find. Exp. and Clin. Pharmacol. - 2005. – V. 27, № 2. - P. 95 - 100.
8. Rao Zhi-ming, Zhang Wang-hua, Li Qiu-zhong et al. // Spectrosc. and Spectral Anal. - 2004. – V. 24, № 3. - P. 278 - 280.

9. Ren Jie, Tang Shu-han, Sun Gui-jin et al. // J. Shenyang Pharm. Univ. - 2005. – V. 22, № 5. – P. 367 - 370.
10. Yang Yan-yun, Li Wen-ping, Liu Qian et al. // West China J. Pharm. Sci. - 2007. – V. 22, № 3. - P. 336 - 338.

Н.Ю. Бондаренко, Н.Е. Блажеевский

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИПИРИДАМОЛА МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

ключевые слова: хемилюминесценция, дипиридамол, гемин

Предложены методики количественного определения дипиридамола в субстанции, модельных растворах и лекарственных формах методом ингибирования хемилюминесции в системе H_2L – H_2O_2 – (*Hem*). *RSD* ≤ 2,85%, δ ≤ + 1,60%.

N.U. Bondarenko, M.Ye. Blazheyevsky

QUANTITATIVE DETERMINATION OF DIPYRIDAMOL BY CHEMILUMINESCENT METHOD

SUMMARY

key words: chemilumeniscens, dipyridamol, hemin

The method of dipyridamol chemilumeniscent determination in substance, model solutions and pharmaceutical preparations based on inhibition of chemilumeniscent oxidation of luminol by hydrogen peroxide, catalyzed by hemin reaction have been elaborated. *RSD* ≤ 2,85%, δ ≤ + 1,60%.