

КЛІНІЧНІ АСПЕКТИ ВИВЧЕННЯ ТА ВПРОВАДЖЕННЯ НОВИХ М'ЯКИХ ЗАСОБІВ

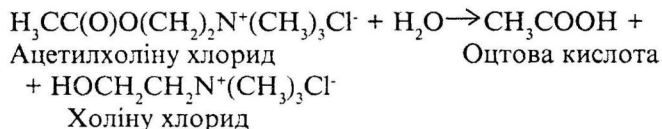
УДК 543.866: 543.066:577.175.822

КІНЕТИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ АЦЕТИЛХОЛІНУ

М.Є. Блажеєвський

Національна фармацевтична академія України

Ацетилхоліну хлорид $\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ – складний ефір оцтової кислоти і холінохлориду є нейрорегулюючим вегетативної нервової системи і тому відіграє важливу роль у живому організмі. Коли нервовий імпульс проходить через нерв, на його кінці виділяється ацетилхолін, який передає імпульс далі у мускул. Ця дія ацетилхоліну згодом припиняється в результаті реакції гідролізу за участю ферменту холінестерази, який присутній у живій тканині і гідролізує ацетилхолін у оцтову кислоту і холін:



У медичній практиці його застосовують як парасимпатоміметичний засіб при спазмах артерій сітківки ока, при атонії кишечника і сечового міхура та деяких видах тахікардії. Вводять підшкірно або внутрішньом'язово по 0,05 – 1,1 г [7].

Для кількісного визначення ацетилхоліну хлориду Міжнародна фармакопея [10] використовує ацидиметрію: після гідролітичного розщеплення препарату розчином лугу надлишок останнього відтитровують хлористоводневою кислотою в присутності фенолфталеїну.

Згідно з фармакопейною статтею (ФС 42-1479-80) [1] вміст основної речовини у препараті знаходять аргентометрично за Фольгардом.

Титриметричні методи відрізняються високою точністю, але реакції, які лежать в їх основі, не є специфічними для ацетилхоліну. Частіше за все ці методи застосовуються для кількісного визначення субстанції ацетилхоліну хлориду.

Оскільки ацетилхоліну хлорид є сіллю тетраалкіламонію, він взаємодіє із осаджувальними «алкалоїдними» реактивами. Повідомлений метод кількісного визначення ацетилхоліну, заснований на його осад-

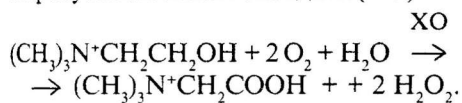
женні дипікриламином або сіллю Рейнеке (за Біатье). Осади в обох випадках розчиняють у ацетоні і одержані розчини фотометрують [5].

Порівняно широкого застосування в практиці біологічних досліджень набув колориметричний метод визначення концентрації ацетилхоліну, запропонований Хестрінім [21]. Суть його полягає в перетворенні ацетилхоліну в ацетгидроксамову кислоту за реакцією ацетилхоліну з гідроксиламіном у лужному середовищі з наступним переведенням її в кислому середовищі у внутрішньокмплексну сполуку із хлоридом феруму (III), яка володіє максимумом світлопоглинання при 520 нм. Чутливість методу ~5 мкг ацетилхоліну. Помилка визначення зазвичай становить $\pm 1\%$. Забарвлені розчини підпорядковуються закону Ламберта-Бера при концентраціях ацетилхоліну 5 – 50 мкг/мл.

У біологічних системах ацетилхолін найчастіше визначають більш чутливими ферментними фотометричними і електрохімічними методами. Найпростіші з них – методи, засновані на реакції гідролізу ацетилхоліну з утворенням оцтової кислоти і вимірюванні інтенсивності забарвлення кислотного індикатора [29] або зміни рН середовища до і після досліду потенціометричним методом [24]. Аналогічний принцип лежить в основі роботи іоно-селективних ферментних електродів [6,12,14,17]. Використання електрода з газовою щільною дозволяє суттєво підвищити вибірковість визначення [8]. Опрацьовані чутливі до ацетилхоліну іон-селективні електроди з рідкою або твердою мембранами, електродна функція яких лінійна в діапазоні концентрацій від 10^{-6} до 10^{-1} М або 10^{-4} – 10^{-1} М ацетилхоліну відповідно [2,11,12]. Для визначення ацетилхоліну *in vivo* також запропоновані субстратні іоно-селективні електроди, в яких аналітичним сигналом виступає спрямований рух заряду трансмембранного переносу ацетилхоліну [28].

Ацетилхолін і продукти його гідролізу не здатні безпосередньо окиснюватися або відновлюватися на електроді. Однак амперметричні ацетилхолінові біо-

сенсори розвиваються успішно. Так, при амперметричному визначенні ацетилхоліну в крові і тканинах застосовують біферментні системи, у яких визначення проводять по зменшенню концентрації утвореного в реакції ферментного гідролізу холіну за допомогою іншого ферментного процесу – окиснення холіну до бетаїну в присутності холінооксидази (ХО):



Швидкість процесу контролюють по зростанню сили струму окиснення утвореного пероксиду водню або зменшенню її в реакції відновлення кисню [13,22]. В останньому випадку аналітичний сигнал лінійно залежить від концентрації ацетилхоліну в інтервалі $1,2 \cdot 10^{-5}$ – $1,9 \cdot 10^{-4}$ М зі стандартним відхиленням 0,3%. На електроді зі сумісно мобілізованими холінестеразою і холінооксидазою в желатиновому гелю анодний струм окиснення пероксиду водню зберігає лінійність в діапазоні концентрацій ацетилхоліну від $5 \cdot 10^{-6}$ до $6,5 \cdot 10^{-4}$ М з похибкою 2% (відн.).

Опрацьована методика кількісного визначення ацетилхоліну в тканинах методом високоефективної рідинної хроматографії із використанням згаданого біферментного реактора, а відтак амперметричним детектуванням утвореного в реакції пероксиду водню [19]. Цей метод дозволяє визначати від $1 \cdot 10^{-12}$ до $50 \cdot 10^{-12}$ М ацетилхоліну хлориду.

Серед інструментальних ферментних методів відомий флуориметричний метод, у якому використовують систему чотирьох послідовно перебігаючих ензиматичних реакцій за участю ацетилхоліну. В одній з них відбувається перетворення нікотинамідного коферменту НАД у НАДН₂. Концентрацію останнього вимірюють флуориметричним методом, який дозволяє визначати до 1 нмоля ацетилхоліну в тканинах [26]. Описаний люмінесцентний метод визначення ацетилхоліну до 0,2 нмоль у пробі [4, 15].

Для визначення малих кількостей ацетилхоліну застосовують маркіровану за фосфором АТФ і біферментну систему ацетилхолінестераза–холінокіназа: ацетилхолінестераза гідролізує ацетилхолін, а холінокіназа перетворює холін у маркірований за фосфором холінофосфат [16]. Проте він характеризується трудномісткістю і тому застосовується рідко.

У деяких нових ферментних методах, які ґрунтуються на застосуванні двох послідовних реакцій за участю ацетилхолінестерази і холінооксидази, контроль за вмістом пероксиду водню здійснюють хемілюмінесцентним методом за каталітичною реакцією окиснення хемілюмінесцентного індикатора люмінолу в присутності пероксидази [25, 27].

Зрозуміло, що застосування чутливих фізико-хімічних методів аналізу дозволяє значно покращити

метрологічні характеристики ферментних методів визначення ацетилхоліну в цілому. Поряд з високою селективністю і чутливістю ферментні методи аналізу володіють ще низкою безумовних переваг: їх легко автоматизувати, вони прості й переважно експресні.

У даній роботі запропонований новий кінетичний метод визначення ацетилхоліну хлориду, який ґрунтується на застосуванні спряженої системи двох послідовних реакцій – пергідролізу ацетилхоліну та індукованої нею реакції перекисного окиснення хромогенного субстрату – *n*-фенетидину. Надоцтова кислота, утворена в первинній реакції пергідролізу ацетилхоліну

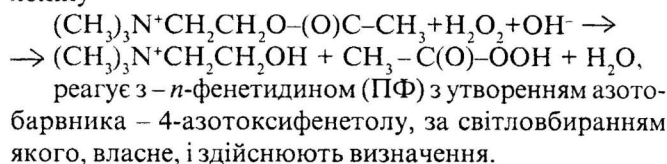
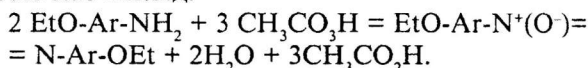


Схема окиснення *n*-фенетидину надоцтовою кислотою має вигляд:



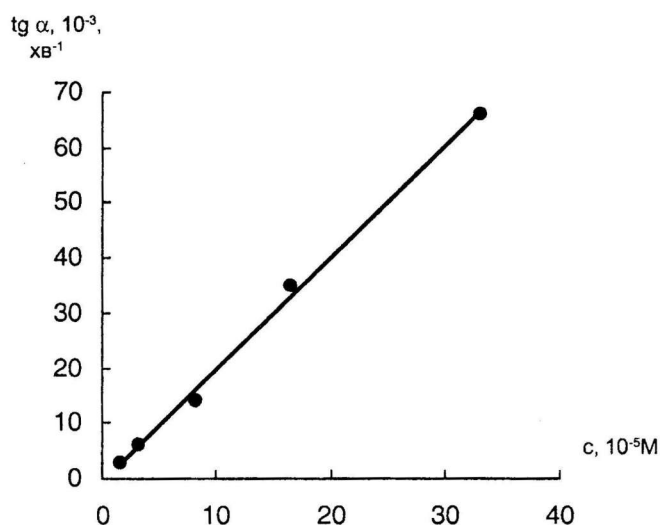
Принципова можливість кількісного визначення ацетилхоліну за згаданими реакціями була продемонстрована в ранній роботі Ганкером зі співробітниками на прикладі *o*-діанізидину [20], проте запропонований ними метод не набув поширення в практиці, що, мабуть, обумовлено виявленими канцерогенними властивостями останнього.

На основі експериментальних даних було встановлено, що в інтервалі рН 8,2–8,5 швидкість утворення 4-азотоксифенетолу в реакції утвореної в попередній стадії визначення надоцтової кислоти з надлишком *n*-фенетидину суворо прямо пропорційна концентрації ацетилхоліну. Більше того, початкова стадія реакції – пергідроліз ацетилхоліну – виявилася лімітуючою стадією усього процесу взагалі. Нами встановлено також, що замість *n*-фенетидину з успіхом може бути застосований *n*-анізидин.

Таким чином, виявлені кінетичні особливості перебігу згаданих вище двох послідовних реакцій у поєднанні з достатньо високою селективністю запропонованої індикаторної реакції на надоцтову кислоту дозволили нам опрацювати новий спосіб визначення мікрокількостей ацетилхоліну.

На рисунку як приклад наведений градувальний графік кількісного визначення ацетилхоліну хлориду за реакцією пероксиду водню з ПФ.

Стандартний розчин ацетилхоліну хлориду – 3,5 г/л. Вміст однієї ампули (0,2 г) фармакопейного препарату розчиняють у 55 мл двічі перегнаної води. Точний вміст розчину встановлювали методом аргентометричного титрування згідно [1]. Робочий стандартний розчин, який містить 0,35 мг/мл, готують із вихідного відповідним розбавленням двічі перегнаною водою.



Градувальний графік визначення ацетилхоліну за реакцією пероксиду водню з *n*-енетидином
 $\omega(\text{H}_2\text{O}_2) = 1\%$, $\omega_{\text{пф}} = 0,1\%$, $\text{pH } 8,4$ ($l = 2 \text{ см}$).

Фосфатний буфер, $\text{pH } 8,4$. До 250,0 мл 0,2 моль/л розчину двозаміщеного фосфату натрію додають 8,0 мл 0,1 моль/л розчину хлористоводневої кислоти.

Розчин пероксиду водню, 10%. 33,3 г пергідролу розчиняють у воді в мірній колбі на 100 мл і доводять об'єм розчину водою до позначки.

Розчин *n*-фенетидину, 1%. 1 г *n*-фенетидину гідрохлориду розчиняють у воді в мірній колбі на 100 мл і доводять об'єм розчину водою до позначки.

Методика визначення ацетилхоліну. У змішувач вносять 10 мл фосфатного буфера, 2 мл 10% пероксиду водню і досліджуваний розчин ацетилхоліну (не більше 5 мл). Одержану суміш ретельно збовтують і термостатують при 37°C протягом 10 хв. Після цього до розчину додають 2 мл 1% розчину *n*-фенетидину, доводять загальний об'єм розчину до 20,00 мл водою, вмикають секундомір і реєструють оптичну густину розчину (СФ-26, ЛОМО) в кюветі з товщиною шару 2 см при 358 нм впродовж 15 хв через кожні 1–2 хв. Будують кінетичні криві в координатах оптична густина D – час (у хв) і знаходять тангенс кута нахилу лінійних ділянок.

Вміст ацетилхоліну знаходять за попередньо побудованим градувальним графіком $\text{tg } \alpha$ – концентрація ацетилхоліну хлориду, моль/л.

Нижня межа визначуваних концентрацій ацетилхоліну хлориду Сн становить 0,5 мкг до мл кінцевого об'єму розчину. При визначенні 4...40 мкг/мл ацетилхоліну хлориду відносна помилка не перевищує $\pm 2\%$ ($n=5$, $P=0,95$).

ВИСНОВКИ

Опрацьовано новий кінетичний метод визначення ацетилхоліну у водних розчинах.

ЛІТЕРАТУРА

1. ФС 42-1479–80. Ацетилхолін-хлорид 0,1 і 0,2 г для ін'єкцій.
2. Байулеску Г., Кошофрець В. Применение ионоселективных мембранных электродов в органическом анализе / Пер. с англ. – М.: Мир, 1980. – 230 с.
2. Будников Г.К., Медянцева Э.П., Бабкина С.С. // Успехи химии, 1991. – Т. 60. – № 4. – С. 880.
3. Гончарова В.А., Доценко Е.К. Флуориметрический метод определения содержания ацетилхолина в крови // Лаб. дело. – 1969. – № 7. – С. 29–31.
4. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Химия, 1975. – 360 с.
5. Матерова Е.А., Никольская Е.Б. // Успехи химии. 1980. – Т. 69. – № 10. – С. 1937.
6. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – 13-е изд. – Х.: Торсинг, 1997. – Т. 1. – 560 с.
7. Никольская Е.Б., Евтюгин Г.А. // Журнал аналит. химии. – 1992. – Т. 47, № 8. – С. 1358–1377.
8. Никольская Е.Б., Святковский А.В. Ионный обмен и ионометрия. – Л.: ЛГУ, 1986. – № 5. – С. 167.
9. Полудек-Фабини Р., Бейрих Т. Органический анализ / Пер. с нем.; Под ред. А.Б. Томчина. – Л.: Химия, 1981. – 624 с.
10. Baum G. // Anal. Lett. – 1970. – V. 3. – P. 105.
11. Baum G., Lynn., Ward F.B. // Anal. Chim. Acta. – 1973. – V. 65. – P. 385.
12. Campanella L., Sammarfino M.P., Tomassetti M. // Anal. Lett. – 1989. – V. 22, № 6. – P. 1389.
13. Durand P., David A., Thomas D. // Biochem. Biophys. Acta. – 1978. – V. 527. – P. 277.
14. Fellmann J.H. Determination of acetylcholine: Its application in a study of presynaptic release and a choline acetyltransferase assay // J. Neurochem. – 1969. – V. 16, № 2. – P. 135–143.
15. Gilberstadt M.L., Russel J.A. // Anal. Biochem. – 1984. – V. 138, № 1. – P. 78.
16. Guibault G.G. Enzymatic methods of analysis London – N. Y.: Pergamon Press. – 1970. – P. 362.
17. Guibault G.G., Ivase A. // Anal. Chim. Acta. – 1976. – V. 85, № 2. – P. 295.
18. Gunaratna P.C., Wilson G.S. // Anal. Chem. – 1990. – V. 62, № 4. – P. 402.
19. Hanker J.S., Gelberg A., Witten B. // J. Am. Pharm. Assoc. – 1958. – V. 157, № 10. – P. 728–730.

20. Hestrin S. // *J. Biol. Chem.*— 1949.— V. 180, № 1.— P. 241–261.
21. Loffler U., Wollenberger U., Schaller F., Gopel W. // *Fr. Z. anal. Chem.*— 1989.— V. 335, № 3.— P. 295.
22. Mascini M., Moscone D. // *Anal. Chem. Acta.*— 1986.— V. 179.— P. 439.
23. Michel H.O. // *J. Lab. Clin. Med.*— 1949.— V. 34.— P. 1564–1568.
24. Moris Ph., Alexandre I., Roger M., Remacle J. // *Anal. Chim. Acta.*— 1995.— 302, № 1.— P. 53–59.
25. O'Neill J.J., Sakamoto T. *Enzymic fluorometric determination of acetylcholine in biological extracts.* // *J. Neurochem.*— 1970.— V. 17, № 10.— P. 1451–1460.
26. Roda A., Rauch P., Ferri E., Girotti S., Chini S., Carrea G., Bovara R. // *Anal. Chim. Acta.*— 1994.— V. 294.— P. 35–42.
27. Senda M., Kakutani T., Osokai T., Okouchi P. // *Bioelectroanal. 1.: Ist. Symp. Matrafured.*— 1986.; 1987.— P. 353.
28. Shikata S., Takahashi H. // *Bull. Yamaguchi Med. School.*— 1953.— V. 1, № 2.— P. 188.