

ВИЗНАЧЕННЯ КАТЕХОЛАМІНІВ У ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ МЕТОДОМ ІНГІБУВАННЯ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ

М.Є.Блажеєвський, Н.Ю.Бондаренко

Національний фармацевтичний університет,
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: press@ukrfa.kharkov.ua

Ключові слова: адреналін; дофамін; хемілюмінесценція

Розроблені методики хемілюмінесцентного визначення адреналіну та дофаміну в субстанціях та ін'єкційних розчинах, що ґрунтуються на інгібуванні реакції хемілюмінесцентного окиснення люмінолу гідрогену пероксидом у присутності каталізатора — гемоглобіну крові людини. Відносне стандартне відхилення не перевищує $\pm 2,8\%$. Нижня межа визначуваних концентрацій для адреналіну та дофаміну становить $1 \cdot 10^{-7}$ М.

DETERMINATION OF CATECHOLAMINES IN MEDICINAL FORMS BY THE CHEMILUMINESCENCE INHIBITION

M.Ye.Blazheyevskiy, N.Yu.Bondarenko

The methods of adrenaline and dopamine chemiluminescent determination in substances and injection solutions based on the inhibition of luminol chemiluminescent oxidation reaction by hydrogen peroxide in the presence of human blood hemoglobin have been developed. The relative standard deviation does not exceed $\pm 2,8\%$. The lower limit of the concentration determined for adrenaline and dopamine is $1 \cdot 10^{-7}$ M.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ МЕТОДОМ ИНГИБИРОВАНИЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Н.Е.Блажеевский, Н.Ю.Бондаренко

Разработаны методики хемилюминесцентного определения адреналина и дофамина в субстанциях и инъекционных растворах, основанные на ингибировании реакции хемилюминесцентного окисления люминола пероксидом водорода в присутствии гемоглобина крови человека. Относительное стандартное отклонение не превышает $\pm 2,8\%$. Нижняя граница определяемых концентраций для адреналина и дофамина составляет $1 \cdot 10^{-7}$ М.

Адреналін (L -1(3,4-діоксиfenіл)-2-метиламіноетанол) (А) є гормоном мізкового шару надниркових залоз. Він належить до групи ендогенних катехоламінів, у молекулах яких міститься діоксифенільне кільце, та є адренергічним засобом. Його попередник у процесі біосинтезу катехоламінів — дофамін (2-(3,4-діоксиfenіл)-етиламін) (ДА) виявляє непряму адреноміметичну дію.

Кількісне визначення А та ДА в теперішній час проводять за допомогою сучасних фізико-хімічних методів аналізу, а саме методами спектрофотометрії [1], флуоресценції [2, 3], високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [4, 5], потенціометрії [6, 7], вольтамперометрії [8-10], капілярного електрофорезу [11, 12] тощо. Особливу увагу привергає високочутливий хемілюмінесценційний метод. Так, кількісне визначення А пропонується виконувати за ефектом інгібування електрохемілюмінесценції в системі $Ru(bpy)_3^{2+}$ /трипропіламін [13] та за ефектом підвищення А емісії хемілюмінесценції (ХМ) люмінолу (H_2L), що окиснюється періодатом у лужному середовищі [14]

(межа виявлення становить $7 \cdot 10^{-9}$ М А в обох методах). Для визначення ДА запропонованій проточно-інжекційний варіант, який ґрунтуються на інгібуванні електрохемілюмінесценції люмінолу (H_2L). Межа виявлення становить 30 нМ ДА [15].

Нами розроблена методика та досліджена можливість здійснення кількісного визначення А в готових лікарських формах кінетичним методом за ефектом інгібування ХМ, яка виникає в системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ (гемоглобін). Згідно з сучасними уявленнями механізм виникнення ХМ може бути зображеній схемою 1 [16].

Механізм виникнення хемілюмінесценції в реакції окиснення люмінолу гідрогену пероксидом у присутності гемоглобіну крові.

При змішуванні лужних розчинів H_2O_2 та H_2L у присутності каталітичної кількості Hb спостерігається ХМ, обумовлена виникненням аніона амінофталевої кислоти у електронно-збудженному стані. Ключовою частиною у послідовності реакцій, які ведуть до виникнення ХМ через утворення трансанулярного пероксиду люмінолу (див.

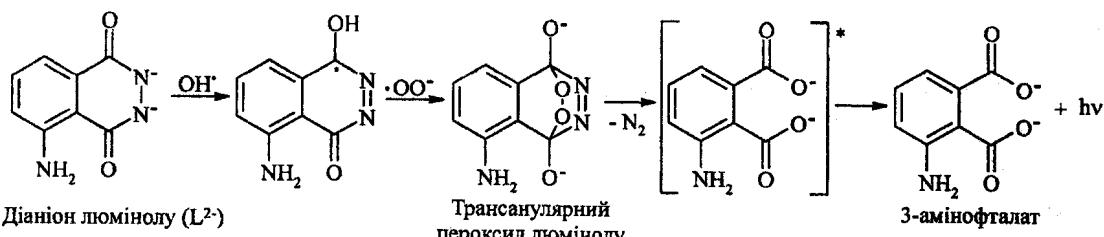


Схема 1. Механізм виникнення хемілюмінесценції.

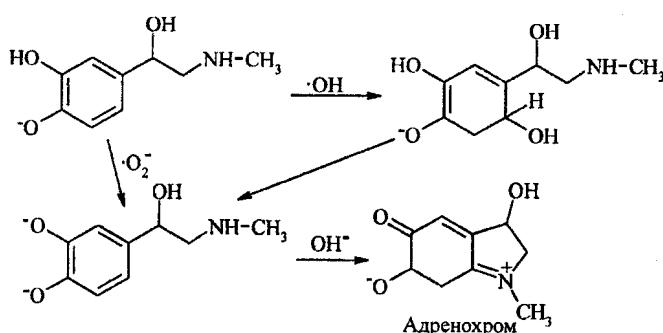


Схема 2. Механізм дезактивації хемілюмінесцентно-активних форм оксигену в реакції з люмінолом під дією адреналіну.

схему 1), при розкладенні якого й утворюється емітер світіння, є аніон-радикал O_2^- . В літературі наявні вказівки на інгібторна дія А або ДА на ХМ в системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ досягається, коли останнім додається розчин гемоглобіну.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що найвища інгібторна дія А або ДА на ХМ в системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ досягається, коли останнім додається розчин гемоглобіну.

Концентраційні залежності I_0/I_{Hb} для А та ДА у логарифмічних координатах мають лінійний характер в інтервалі більше трьох порядків зміни концентрацій інгібіторів (рис. 1 і 2). Для здійснення кількісного визначення інгібіторів в об'єктах регламентованого складу зручно використовувати лінійні ділянки градуювальних залежностей ΔI_{Hb} від концентрації аналітів [18].

Кількісне визначення А та ДА в препаратах виконували методом порівняння зі стандартом, використовуючи лінійні ділянки залежності ΔI_{Hb} від концентрації інгібітора.

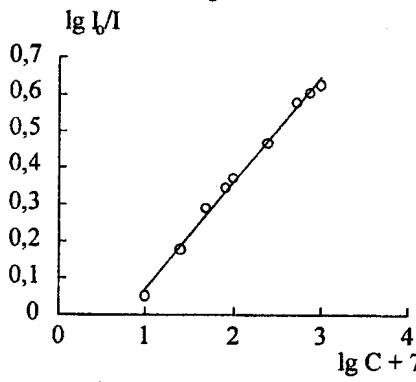


Рис. 1. Концентраційна залежність I_0/I_{Hb} у системі $H_2L - H_2O_2 - (A) - Hb$ в логарифмічних координатах.

У спеціально проведених дослідах встановлено, що інші компоненти комбінованих лікарських форм (дисульфіт натрію, хлорид натрію) не впливали на ефект інгібторної дії А та ДА у ХМ реакції. Оптимальними концентраціями реактивів у досліджуваній хемілюмінесцентній системі є: $c(NaOH)=0,05\text{ M}$, $c(H_2O_2)=0,0375\text{ M}$, $c(H_2L)=2 \cdot 10^{-4}\text{ M}$, $C(Hb)=0,5\text{ мкг/мл}$ та $c(NaOH)=0,06\text{ M}$, $c(H_2O_2)=0,0375\text{ M}$, $c(H_2L)=2 \cdot 10^{-4}\text{ M}$, $C(Hb)=0,5\text{ мкг/мл}$ (для А та ДА відповідно).

Приготування стандартного розчину адреналіну гідротартрату

Розчиняють 0,0910 г адреналіну гідротартрату в мірній колбі місткістю 100 мл. Об'єм розчину доводять до позначки бідистильованою водою при $20^\circ C$. 2 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу місткістю 50 мл та об'єм розчину знову доводять до позначки. Розчин придатний до застосування протягом доби.

Методика кількісного визначення адреналіну гідротартрату в розчині адреналіну гідротартрату для ін'єкцій 0,18% — 1 мл

1 мл 0,18% розчину адреналіну гідротартрату вносять у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять об'єм до позначки бідистильованою водою при $20^\circ C$. Паралельно готують об'ємно-ваговим методом стандартний розчин адреналіну гідротартрату з концентрацією 0,91 мг/мл на бідистильованій воді. У кварцеву кювету послідовно приливають 2 мл $1 \cdot 10^{-3}\text{ M}$ розчину H_2L , 5 мл 0,1 М розчину гідроксиду натрію, 1,25 мл бідистильованої води, 0,25 мл 5% розчину H_2O_2 , 1 мл досліджуваного розчину адреналіну гідротартрату. Одержану суміш перемішують і встановлюють кювету у світло-захисну камеру. Відкривають шторку і вливають

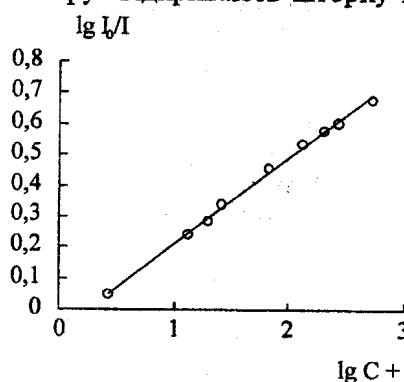


Рис. 2. Концентраційна залежність I_0/I_{Hb} у системі $H_2L - H_2O_2 - (DA) - Hb$ в логарифмічних координатах.

Таблиця 1

Результати кількісного визначення адреналіну гідротартрату в лікарській формі ($n=7$, $P=0,95$)

Вміст адреналіну гідротартрату за прописом, г/мл	Знайдено адреналіну гідротартрату, г/мл	Метрологічні характеристики
0,0016-0,0020 (0,0018)*	0,0018 0,00175 0,0017 0,0018 0,0018 0,00185 0,0018	$\bar{X}=0,0018$ $S=\pm 0,5 \cdot 10^{-4}$ $S_x=\pm 0,2 \cdot 10^{-4}$ $\Delta X=\pm 0,5 \cdot 10^{-4}$ $S_r=\pm 2,8\%$ $\delta=0\%$

Примітка. * - точний вміст встановлено за методикою [19]

за допомогою піпеткового дозувача 0,5 мл розчину НВ.

Аналогічного порядку додавання розчинів дотримуються при виконанні досліду з розчином стандартного зразка. В усіх випадках реєструють максимальне значення інтенсивності світіння у порівнянні з його фоновим значенням, $\Delta I_{ХЛ}$ (відн. од.) Вміст адреналіну гідротартрату у препараті знаходять методом порівняння $\Delta I_{ХЛ}$ з розчином стандартного зразка.

Вміст адреналіну в г на 1 мл препарату (Х) розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot \Delta I_{ХЛ} \cdot 10 \cdot 50,00}{\Delta I_{ст} \cdot 1,00 \cdot 1,00},$$

де: С — концентрація розчину стандартного зразка адреналіну гідротартрату, г/мл;

$\Delta I_{ст}$ — максимальна інтенсивність хемілюмінесценції розчину стандартного зразка адреналіну гідротартрату, відн. од.;

$\Delta I_{ХЛ}$ — максимальна інтенсивність хемілюмінесценції розчину досліджуваного зразка, відн. од.;

10 — об'єм кювети, мл;

50,00 — об'єм мірної колби, використаної для аналізу, мл;

1,00 — об'єм піпетки, мл;

1,00 — об'єм розчину адреналіну гідротартрату, використаного для аналізу, мл.

Приготування стандартного розчину допаміну гідрохлориду

Розчиняють 0,0264 г допаміну гідрохлориду в мірній колбі місткістю 100 мл. Об'єм розчину доводять до позначки бідистильованою водою при 20°C. Розчин придатний до застосування протягом доби.

Методика кількісного визначення допаміну гідрохлориду в розчині дофаміну для ін'єкцій 0,5% — 5 мл

1 мл 0,5% розчину дофаміну вносять у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять об'єм до позначки водою при 20°C. 2 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу місткістю 50 мл та об'єм

Таблиця 2

Результати кількісного визначення допаміну гідрохлориду в лікарській формі ($n=5$, $P=0,95$)

Вміст допаміну гідрохлориду за прописом, г/5 мл	Знайдено допаміну гідрохлориду, г/5 мл	Метрологічні характеристики
0,0225-0,0275 (0,02485)*	0,0247 0,0247 0,0250 0,0250 0,0256 0,0251 0,0247	$\bar{X}=0,0249$ $S=\pm 3,25 \cdot 10^{-4}$ $S_x=\pm 1,2 \cdot 10^{-4}$ $\Delta X=\pm 3,0 \cdot 10^{-4}$ $S_r=\pm 1,3\%$ $\delta=\pm 0,2\%$

Примітка.* - за результатами методу прямої УФ-спектрофотометрії [20].

розчину знову доводять до позначки. Паралельно готують об'ємно-ваговим методом стандартний розчин допаміну гідрохлориду з концентрацією $2 \cdot 10^{-6}$ г/мл на бідистильованій воді. У кварцеву кювету послідовно приливають 2 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М розчину H_2L , 6 мл 0,1 М розчину гідроксиду натрію, 0,25 мл бідистильованої води, 0,25 мл 5% розчину H_2O_2 , 1 мл досліджуваного розчину дофаміну. Далі виконують аналіз як і при визначенні вмісту адреналіну гідротартрату. Вміст дофаміну в г на 5 мл препарату (Х) розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot \Delta I_{ХЛ} \cdot 10 \cdot 100,00 \cdot 5,00 \cdot 25}{\Delta I_{ст} \cdot 1,00 \cdot 1,00},$$

де: С — концентрація розчину стандартного зразка допаміну гідрохлориду, г/мл;

$\Delta I_{ст}$ — максимальна інтенсивність хемілюмінесценції розчину стандартного зразка допаміну гідрохлориду, відн. од.;

$\Delta I_{ХЛ}$ — максимальна інтенсивність хемілюмінесценції розчину досліджуваного зразка, відн. од.;

10 — об'єм кювети, мл;

100,00 — об'єм мірної колби, використаної для аналізу, мл;

5,00 — об'єм лікарської форми за прописом;

1,00 — об'єм піпетки, мл;

1,00 — об'єм розчину допаміну гідрохлориду, використаного для аналізу, мл;

25 — розведення.

Отже, як видно з наведених даних, одержані результати характеризуються задовільною репродуктивністю — відносне стандартне відхилення не перевищує $\pm 2,8\%$. Сульфіт та хлорид натрію, які входять до складу лікарських форм, не заважають аналізу, що вигідно відрізняє опрацьовану нами методику від відомої [14]. Нижня межа визначуваних концентрацій Сн становить $1 \cdot 10^{-7}$ М для А та ДА.

Експериментальна частина

Для досліджень використовували субстанції адреналіну гідротартрату, допаміну гідрохлориду та лікарські форми, що містять адреналін та дофамін: розчин адреналіну гідротартрату 0,18% для ін'єкцій (ВАТ “Фармацевтична фірма “Здоров'я”,

Харків, Україна, серія 50802); розчин допаміну гідрохлориду 0,5% для ін'єкцій ("Дарниця", Київ, Україна, серія 80703).

Вихідний 0,001 М розчин люмінолу (5-аміно-2,3-дигідро-1,4-фталазиндіон, H₂L, "Хемапол", Чехія) готували з очищеного комерційного препарату перекристалізацією з льодової ацетатної кислоти в присутності активованого вугілля, а відтак — з насиченого розчину лугу за точною наважкою у 0,01 М розчині гідроксиду натрію. У роботі використовували розчини лугу без карбонатів.

Для підтримки необхідної кислотності середовища використовували 0,1 М розчин гідроксиду натрію, pH розчинів контролювали за допомогою скляного індикаторного електрода ЕСЛ-43-07 у парі з насиченим хлоридсрібним електродом та іономіра лабораторного I-130. Усі розчини готували на двічі дистильованій воді.

Розчин гідрогену пероксиду 5% (мас.) готували із 50%-ного препарату о.с.ч. розбавленням його водою з наступним контролем концентрації перманганатометрично.

Застосовували гемоглобін крові людини (Hb) виробництва фірми "Simko Ltd", м. Львів, Україна. Вихідний розчин гемоглобіну 75 мг/мл готували розчиненням 7,5 мг гемоглобіну в 75 мл

бідистильованої води при нагріванні та додаванні 0,5 г натрію дигідрогену фосфату. Об'єм доводили до позначки водою при 20°C і перемішували. Робочий розчин гемоглобіну готували розбавленням вихідного бідистильованою водою точно в 100 разів. Розчин придатний до застосування протягом доби.

Інтенсивність ХМ вимірювали як в роботі [18]. Інгібуючий вплив А та ДА оцінювали за величиною депресії (зменшення) максимальної інтенсивності:

$$\text{ХМ } \Delta I_{\text{ХЛ}} = I_0 - I_{\text{ХЛ}},$$

де: I_0 (відн. од.) — максимальна інтенсивність ХМ у відсутності А та ДА;
 $I_{\text{ХЛ}}$ (відн. од.) — максимальна інтенсивність ХМ у присутності А та ДА.

Висновки

1. Вперше вивчений інгібіторний вплив адреналіну та дофаміну на хемілюмінесцентну реакцію окиснення люмінолу гідрогену пероксидом у лужному середовищі в присутності гемоглобіну.
2. Опрацьовані методики кількісного визначення адреналіну та дофаміну в субстанції та лікарських формах методом хемілюмінесценції.

Література

1. Блажеєвський М.Є., Томаровська Т.О. // Фізіологічно активні речовини. — 2001. — №2. — С. 37-40.
2. Tong Changlun, Zhu Yan, Jinghe Yang // Anal. Chem. — 2000. — Vol. 28, №3. — P. 293-295.
3. Wang Huai You, Sun Yue, Tang Bo // Talanta. — 2002. — Vol. 57, №5. — P. 899-907.
4. Hansen A. M., Kristiansen J., Nielsen J. L. et al. // Talanta. — 1999. — Vol. 50, №2. — P. 367-379.
5. Fotopoulos Maria A., Joannou Penelope C. // Anal. Chim. Acta. — 2002. — Vol. 462, №2. — P. 179-185.
6. Блажеєвський М.Є., Томаровська Т.О., Кабачний В.І. // Вісник фармації. — 1998. — №1. — С. 56-59.
7. Шведене Н.В., Бердникова Л.П., Бахмутова Е.В. и др. // Вестн. МГУ. Сер. 2. — 1999. — Т. 40, №4. — С. 237-240.
8. Гедмина А.В., Шайдарова Л.Г., Будников Г.К. // Всерос. конф. "Актуальные проблемы аналитической химии", 11-15 марта 2002: Тез. докл. — М., 2002. — Т. 2. — С. 123.
9. Oni Joshua, Nyokong Tebello // Anal. Chim. Acta. — 2001. — Vol. 434, №1. — P. 9-21.
10. Mo Jian-Wei, Ogorevc Bozidar // Anal. Chem. — 2001. — Vol. 73, №6. — P. 1196-1202.
11. Zhou Tianshu, Hu Qin, Yu Hui et al. // Anal. Chim. Acta. — 2001. — Vol. 441, №1. — P. 23-28.
12. Zhang Dongming, Fu Min, Ma Wanyun, Chen Dieyan // Anal. Sci. — 2001. — Vol. 17, №11. — P. 1331-1333.
13. Li Feng, Gui Hua, Lin Xiang-Qin // Anal. Chim. Acta. — 2002. — Vol. 471, №2. — P. 187-194.
14. Zhou Guo-Jun, Zhang Guo-Fang, Chen Hong-Yuan // Anal. Chim. Acta. — 2002. — Vol. 463, №2. — P. 257-263.
15. Zhu Liande, Li Yingxiu, Zhu Guoyi // Anal. Lett. — 2002. — Vol. 35, №15. — P. 2527-2537.
16. Владимиров Ю. А. // Соросовский образоват. журн. — 2001. — Т. 7, №1. — С. 16-23.
17. Ludovit Bergendi. Superoxid a ine bioreaktivne formy kyslika. — Bratislava: VEDA, 1988. — 198 c.
18. Блажеєвський М.Є., Бондаренко Н.Ю. // Фарм. журн. — 2004. — №5. — С. 68-73.
19. Максютина Н.П., Каган Ф.Е., Кириченко Л.А. и др. Методы анализа лекарств. — К.: Здоров'я, 1984. — 222 с.
20. Афхами А., Хатами Х.А. // Журн. аналіт. хімії. — 2003. — Т. 58, №2. — С. 157-160.

Надійшла до редакції 14.02.2005 р.