

М.Є.БЛАЖЕЄВСЬКИЙ, канд. хім. наук, доц., В.В.ДЯДЧЕНКО, канд. хім. наук  
 Національний фармацевтичний університет,  
 Харківський гвардійський орден Червоної Зірки інститут танкових військ  
 ім. Верховної Ради України Національного технічного університету «ХПІ»

## ЕНЗИМНО-КІНЕТИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ НІКОТИНУ ТА АНАБАЗИНУ ЗА АНТИХОЛІНЕСТЕРАЗНОЮ АКТИВНІСТЮ

Алкалоїди належать до нітрогеновмісних гетероциклічних сполук складної будови, переважно рослинного походження, які справляють сильну біологічну дію. Серед них особливе місце займають похідні піридину та піперидину, а саме *нікотин* [3-(N-метилпіролідил-2')піридин] та *анабазин* [3-(піперидил-2)-піридин], які містяться в тютюні, хвощі польовому, плаунах (*нікотин*) та їжачнику безлистому (*анабазин*) [5]. Обидві сполуки в малих дозах застосовуються в медицині як лікарські засоби у вигляді жуйок, плівок тощо, що полегшують відвикання від паління (анабазину гідрохлорид, нікотин) [6], а також як інсектициди в сільському господарстві (анабазину сульфат, нікотину сульфат) та у ветеринарії для боротьби з нашкодливими паразитами тварин (анабазин) [5].

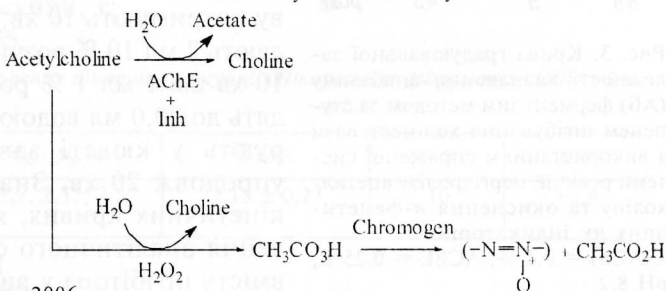
Нікотин та анабазин є антагоністами певних ацетилхолінових рецепторів, які зворотно інгібують фермент холінестеразу [7]. Цю властивість було покладено в основу створення біосенсору для визначення алкалоїдів. Так, у 1978 р. Трен-Мінк із співробітниками вперше на основі скляного рН-електрода сконструювали ацетилхолін-селективний електрод і показали можливість його застосування для кількісного визначення нікотину в межах  $1 \cdot 10^{-3} \dots 1 \cdot 10^{-1}$  моль/л [14]. Рекомендовані у теперішній час інші методики кількісного визначення нікотину та анабазину методами хроматомаспектроскопії [9, 11, 13], ГРХ [8], ВЕРХ [12] вимагають дорогого обладнання, висококваліфікованих спеціалістів та довготривалі у часі. Отже, опрацювання нових, більш досконалих та простих методів аналізу залишається і надалі актуальним питанням.

Мета даної роботи — розробка високоселективної і достатньо чутливої методики кількісного визначення нікотину та анабазину біохімічним методом за їх антихолінестеразною активністю.

В основу новоопрацьованих методик покладено запропонований нами раніше новий спосіб здійснення визначення інгібіторів холінестераз кінетичним методом у спектрофотометричному варіанті з використанням реакції *Шенемана* як індикаторної на непрореагований ацетилхолін [1, 3, 4]. Для вимірювання оптичної густини використовували спектрофотометр СФ-26 (ЛОМО, СРСР), решта — як у роботі [2]. Для активації алкалоїдів у біохімічній реакції використовували пероцтову кислоту виробництва фірми «Імпульс» (Гданськ, Польща). Аналітична система, яка ілюструє принцип методу ензимно-кінетичного визначення інгібіторів, наведена на схемі.

Кінетичні криві спряженого окиснення індикаторної речовини — *n*-фенетидину (*Chromogen*) гідроген пероксидом у присутності ацетилхоліну (ACh), ацетилхоліну і холінестерази (ChE), а також ацетилхоліну і холінестерази, попередньо проінкубованої з різною кількістю активова-

Схема аналітичної системи ензимно-кінетичного визначення нікотину та анабазину



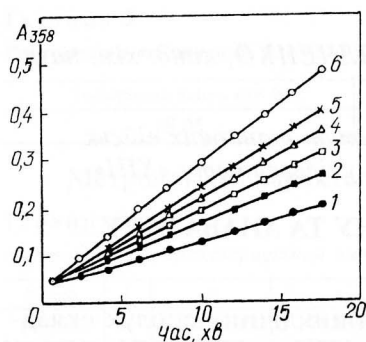


Рис. 1. Кінетичні криві спряженого окиснення *n*-фенетидину гідроген пероксидом у присутності:

1 – ACh + ChE, 2 – 5 – ACh + (ChE + НК), 6 – ACh. C(ACh) = 0,1 %; AChE = 0,25 Е; C(НК), моль/л: 2 –  $1 \cdot 10^{-5}$ ; 3 –  $3 \cdot 10^{-5}$ ; 4 –  $6 \cdot 10^{-5}$ ; 5 –  $9 \cdot 10^{-5}$

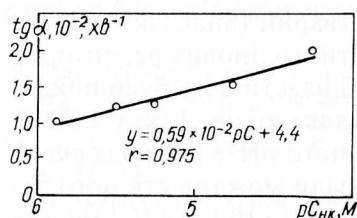


Рис. 2. Крива градувальної залежності визначення нікотину (НК) ферментним методом за ступенем інгібування холінестерази з використанням спряженої системи реакцій пергідролізу ацетилхоліну та окиснення *n*-фенетидину як індикаторної.

C(ACh) = 0,1 %; AChE = 0,25 Е; рН 8,2

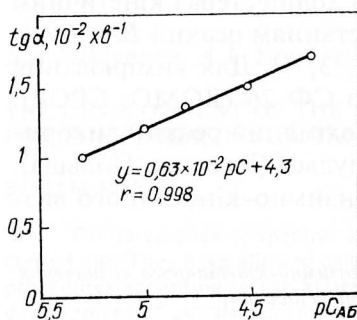


Рис. 3. Крива градувальної залежності визначення анабазину (АБ) ферментним методом за ступенем інгібування холінестерази з використанням спряженої системи реакцій пергідролізу ацетилхоліну та окиснення *n*-фенетидину як індикаторної.

C(ACh) = 0,1 %; AChE = 0,25 Е; рН 8,2

ного у попередній стадії аналізу нікотину (НК), подано на рис. 1, з якого видно, що швидкість реакції (нахил кривих) зростає пропорційно до кількості нікотину в системі.

За допомогою спеціально проведених порівняльних дослідів з нативним нікотинном, активованим нікотинном за допомогою окиснення його пероцтовою кислотою та наперед одержаним зустрічним синтезом *Pi*-N-оксидом нікотину було встановлено, що в результаті активації нікотину відбувається утворення *Pi*-N-оксиду нікотину, а відтак антихолінестеразна активність останнього зростає більше як на порядок.

Градувальні залежності визначення нікотину (НК) та анабазину (АБ) (після попереднього їх активування) ферментним методом за ступенем інгібування холінестерази з використанням спряженої системи реакцій пергідролізу ацетилхоліну та окиснення *n*-фенетидину гідроген пероксидом як індикаторної, представлені відповідно на рис. 2 та 3, мають лінійний характер, що спрощує виконання кількісного визначення інгібіторів ферментним методом у широких концентраційних межах. Нижня межа визначення нікотину та анабазину становить відповідно  $3 \cdot 10^{-6}$  та  $6 \cdot 10^{-6}$  моль/л. При п'ятикратному визначенні  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л нікотину та анабазину в модельних розчинах відомого складу відносно стандартне відхилення не перевищує 8 % ( $\delta = -2$  % та  $\delta = -1,5$  % для анабазину та нікотину).

Розроблені нами методики вигідно відрізняються від відомих біохімічних вищою чутливістю і характеризуються задовільною точністю.

**Методика аналізу.** До 10 мл 0,2 моль/л фосфатної буферної суміші послідовно додають не більше 4,0 мл випробуваного або стандартного  $10^{-3}$  моль/л чи  $10^{-4}$  моль/л розчину інгібітора (НК або АБ, які попередньо активують шляхом обробки проби пероцтовою кислотою впродовж однієї години при 323–333 К, переливають у чарунку для вимірювання електропровідності з платиновими електродами і залишають на 7–10 хв), охолоджують до 311 К, додають 2,0 мл 8 мг/мл розчину холінестерази та інкубують упродовж 20 хв при 311 К. Після цього додають 1,0 мл 0,1 % розчину ацетилхоліну і знову витримують 10 хв; потім при перемішуванні додають 2 мл 10 % розчину гідроген пероксиду і після 10 хв ще 1 мл 1 % розчину *n*-фенетидину та доводять до 20,0 мл водою при 293 К. Розчин фотометрують у кюветі завтовшки 1 см при 358 нм упродовж 20 хв. Знаходять тангенс кута нахилу кінетичних кривих, які використовували як значення аналітичного сигналу у  $\text{хв}^{-1}$ , що відповідає вмісту інгібітора у випробуваному розчині.

Опрацьована нами методика була використана для здійснення аналізу гумової жуйки «Нікоретте» по 2 мг нікотину виробництва фірми Pharmacia (США), серія DE067A. До складу (основи) жуйки входить сорбіт, масло м'яти перцевої та інші компоненти — в достатній кількості для одержання лікарської форми.

Кількісне визначення нікотину в гумці за Європейською фармакопеею [10] рекомендується виконувати методом рідинної хроматографії з використанням як стандарту дитартрату нікотину після екстракції нікотину амоніаковим розчином із суспензованої в гексані гумової жуйки. У препараті має бути не менше 95,0 і не більше 115,0 % нікотину у перерахунку на суху субстанцію хімічної формули  $C_{10}H_{14}N_2$  [10].

**Кількісне визначення нікотину в гумовій жуйці.** Зважують жуйку (вагою приблизно 1 г), подрібнену за допомогою скальпеля в хімічному стакані, з точністю  $\pm 0,1$  мг, додають 5 мл гексану й обережно перемішують до повного розчинення наважки. Після цього послідовно додають 10 мл дистильованої води, 10 мл концентрованого амоніаку, збовтують і кількісно переносять до ділильної лійки на 100 мл за допомогою 5 мл гексану. Лійку закорковують, збовтують упродовж 10 хв і після розшарування суміші відокремлюють водний розчин (нижній шар) в мірну колбу на 50 мл. Операцію екстракції повторюють з наступними 5 мл дистильованої води і 8 мл амоніаку і об'єднані розчини зливають до тієї ж колби. У разі необхідності водний розчин фільтрують через паперовий фільтр «рожева стрічка». Об'єднаний водний розчин нейтралізують за універсальним індикаторним папірцем 17 мл концентрованої хлористоводневої кислоти до рН 9, додають 2 мл  $1 \cdot 10^{-2}$  М розчину пероцтової кислоти, ретельно перемішують і витримують на водяному огрівнику при 333 К упродовж однієї години. Розчин переливають у чарунку для вимірювання електропровідності з платиновими електродами і залишають на 7—10 хв, потім охолоджують до 311 К. Після цього об'єм доводять до позначки дистильованою водою і розчин ретельно перемішують. Виконують визначення нікотину ензимно-кінетичним методом, використовуючи 1,0 мл розчину.

**Виготовлення розчину стандартного зразка нікотину.** Наважку 16,0 мг свіжоперегнаного з водяною парою нікотину основи та висушеного ефіром (вміст основної речовини за даними ацидиметрії становив  $99,2 \pm 0,9$  %) розчиняють у 40,0 мл гексану (293 К) при перемішуванні, відбирають 5,0 мл гексанового розчину і далі все виконують як при кількісному визначенні нікотину в гумовій жуйці, починаючи зі слів: «Після цього послідовно додають 10 мл дистильованої води ...».

Вміст нікотину в жуйці при врахуванні  $w$ , % вологості  $X$  у мг розраховують за формулою

$$X = \frac{tg\alpha(cm) \cdot C \cdot \bar{m} \cdot 100}{tg\alpha(x) \cdot a \cdot (100 - w)},$$

де  $tg\alpha(cm)$  — нахил кінетичної кривої розчину зі стандартним зразком,  $хв^{-1}$ ;

$tg\alpha(x)$  — нахил кінетичної кривої з випробуваним розчином,  $хв^{-1}$ ;

$C$  — вміст нікотину в 5,00 мл розчину стандартного зразка, мг;

$a$  — наважка препарату, г;

$\bar{m}$  — середня маса гумової жуйки, г;

$w$  — вміст вологи в жуйці, %.

Результати ензимно-кінетичного визначення нікотину в жуйці «Нікоретте» (Фармація, США) 2 мг ( $n = 5$ ;  $P = 0,95$ )

Вміст $C_{10}H_{14}N_2$ за прописом, мг	Знайдено $C_{10}H_{14}N_2$ , мг	$\bar{X} \pm \Delta X$	$S_r$ , %	$\delta$ , %
2 (−0,1... + 0,3)* 2,1**	1,8; 2,1; 2,2; 2,35; 2,3	2,15 $\pm$ 0,27	10	+2,4

\* Європейська фармакопея [10].

\*\* Визначено за методом полярографії.

Отже, результати аналізу готової лікарської форми жуйки «Нікоретте» на вміст нікотину, одержані за новоопрацьованою ензимно-кінетичною методикою (див. табл.), свідчать про можливість здійснення кількісного визначення нікотину в жуйці. Відносне стандартне відхилення не перевищує 10 % при вмісті нікотину 2 мг ( $\delta = +2,4 \%$ ). Опрацьована альтернативна методика вигідно відрізняється від відомої стандартної, виконуваної методом вискоєфективної рідинної хроматографії, простотою здійснення аналізу.

## Висновки

1. Розроблені методики та показана можливість кількісного визначення нікотину та анабазину у водних розчинах ензимно-кінетичним методом за антихолінестеразною активністю їх продуктів пероксикислотного окиснення з використанням як індикаторної на непрореагований ацетилхолін реакції окиснення *n*-фенетидину. Нижня межа визначення нікотину та анабазину становить  $3 \cdot 10^{-6}$  та  $6 \cdot 10^{-6}$  моль/л відповідно. При визначенні  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л аналітів у модельних розчинах відносне стандартне відхилення не перевищує 8 % ( $\delta = -2 \%$  та  $-1,5 \%$  для анабазину та нікотину відповідно).

2. Показана можливість здійснення кількісного визначення нікотину у гумовій жуйці «Нікоретте» по 2 мг за відповідним *Pi*-N-оксидом нікотину новоопрацьованим ензимно-кінетичним методом. Відносне стандартне відхилення не перевищує 10 % при вмісті нікотину 2 мг ( $\delta = +2,4 \%$ ).

1. Блажеевский Н.Е. // Аналитика и аналитики: Каталог рефератов и статей Международ. форума (Воронеж, Россия, 2—6 июня 2003 г.): В 2 т. / Науч. ред. Я.И.Коренман. — Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. технолог. акад., 2003. — Т. 2. — С. 431.
2. Блажеевський М.Є. // Вопр. химии и хим. технологии. — 2003. — № 6. — С. 11—18.
3. Блажеевський М.Є. // Матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. «Фармація ХХІ ст.». — Х.: Золоті сторінки, 2002. — С. 99—100.
4. Блажеевський М.Є. // Там же. — С. 100—101.
5. Крамаренко В.Ф., Туркевич Б.М. Анализ ядохимикатов. — М.: Химия, 1978. — 264 с.
6. Крыжановский С.А., Вититнова М.Б. Полный современный справочник лекарственных препаратов. Практическое руководство. — 2-е изд. — М.: РИПОЛ КЛАССИК, 2002. — 1216 с.
7. Михельсон М.Я. Действие наркотиков на холинэстеразу. — Л.: Изд-во Военно-морской академии, 1945. — 208 с.
8. Davis R.A. // J. Chromatogr. Sci. — 1986. — Vol. 24, № 1. — P. 134—141.
9. Meger Michael, Meger-Kossien Irmitrud, Schuler-Metz Annette et al. // J. Chromatogr. B. — 2002. — Vol. 778, № 1—2. — P. 251—261
10. European Pharmacopoeia. — 4 ed. Council of Europe. — Strasbourg: EDQM, 2003. — P. 3479—3481.
11. Stolker A.A.M., Hogendoorn Niesing W., Rambali A. Bisoen et al. // J. Chromatogr. A. — 2003. — Vol. 1020, № 1. — P. 35—43.
12. Tambwekar Kaustubh R., Kakariya Ritesh B., Gard Sanjay // J. Pharm. and Biomed. Anal. — 2003. — Vol. 32, № 3. — P. 441—450.
13. Torano Javier Sastre, Van Kan Hendrikus J.M. // Analyst. — 2003. — Vol. 128, № 7. — P. 838—843.
14. Tran-Minh Canh, Guyonnet Rene // Comp. Rend. Herbd. Seances Acad. Sci., Ser. C. — 1978. — Vol. 286, № 12. — P. 357.

Надійшла до редакції 21.03.2006.

Н.Е.Блажеевский, В.В.Дядченко

## ЭНЗИМНО-КИНЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНА И АНАБАЗИНА ПО АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Разработаны методики и показана возможность количественного определения никотина и анабазина в водных растворах энзимно-кинети́ческим методом по антихолинэстеразной активности их продуктов окисления (в случае никотина в виде *Pi*-N-оксида никотина) с использованием как индикаторной на остаточный ацетилхолин реакции окисления *n*-фенетидина. Нижняя граница определяемых концентраций никотина и анабазина составляет  $3 \cdot 10^{-6}$  и  $6 \cdot 10^{-6}$  моль/л соответственно. При определении  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л аналитов относительное стандартное отклонение не превышает 8 % (правильность составляет  $-2 \%$  и  $-1,5 \%$  для анабазина и никотина соответственно).

Показана возможность осуществления количественного определения никотина в жевательной резинке «Нікоретте» по 2 мг по соответствующему *Pi*-N-оксиду никотина новоразработанным энзимно-кинети́ческим методом. Относительное стандартное отклонение не превышает 10 % при содержании никотина 2 мг ( $\delta = +2,4 \%$ ).



ENZYME-KINETIC DETERMINATION OF THE NICOTINE AND ANABASINE  
BY THEIR ANTICHOLINESTERASE ACTIVITY

SUMMARY

Techniques are developed and it is shown the opportunity of quantitative determination of nicotine and anabasine in aqueous solutions by enzyme-kinetic method by anticholinesterase activity their oxidates (in case of nicotine in the form of nicotine *Pi*-N-oxide) with use as to indicator oxidizing reaction of *n*-phenetidine on residual acetylcholine. The bottom limit of determination concentration of nicotine and anabasine makes  $3 \cdot 10^{-6}$  mole/L and  $6 \cdot 10^{-6}$  mole/L accordingly. At determination  $1 \cdot 10^{-5}$  mole/L analytic form the relative standard deviation does not exceed 8 % (correctness makes  $-2$  % and  $-1,5$  % for anabasine and a nicotine accordingly).

The opportunity of exercise of quantitative determination of nicotine in chewing gum «Nicorette» of 2 mg by corresponding nicotine *Pi*-N-oxide by new developed enzyme-kinetic method is shown. The relative standard deviation does not exceed 10 % at the maintenance of nicotine of 2 mg ( $\delta = +2,4$  %).

УДК 615.9.07:547.781.1

*О. О. МАМИНА, канд. хим. наук, доц., В. В. БОЛОТОВ, д-р хим. наук, проф.*

*Национальный фармацевтический университет*

**ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА МЕТОДІВ ОЧИЩЕННЯ  
ХЛОРОФОРМНИХ ВИТЯЖОК З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ**

При ізолюванні отрут різними розчинниками з біологічного матеріалу вибір оптимальних умов очищення витяжок від соекстрактивних речовин має значний вплив на кінцевий результат аналізу, тому що зменшує фон домішок та знижує можливість появи псевдопозитивних та псевдонегативних результатів. Вибір оптимальних умов очищення витяжок також забезпечує концентрування отруту, що обумовлює можливість застосування високочутливих методів ідентифікації та кількісного визначення досліджуваних речовин.

Одним з актуальних напрямків хіміко-токсикологічного аналізу є проведення досліджень первинних витяжок з біологічного матеріалу без додаткового очищення. Для того, щоб уникнути впливу значної кількості домішок на кінцевий результат, різними авторами рекомендовані різні методики досліджень: зокрема А.В.Титова [11] пропонувала використання радіоактивних ізотопів як мітчиків для аналізу наркотичних і токсичних речовин; Д.Ю.Роговський [8] застосовував фотометричний метод кількісного визначення отруту на фоні домішок з використанням частини витяжки з органів трупа для побудови градувального графіка методом добавок; В.А.Карташов використовував методики стандартних проб, які базувалися на додаванні до досліджуваних проб зазначеного об'єму розчинів отруту, а до стандартних та контрольних проб — такого ж об'єму розчинника; Т.Х.Вергейчик та співробітники [2] застосовували метод ортогональних функцій для того, щоб нівелювати вплив фону соекстрактивних речовин на результати аналізу; Е.І.Стадниченко [10] використовувала середні значення оптичної густини контрольних дослідів, які були отримані методом екстракційної фотометрії після екстракції домішок з органів трупів (печінки, мозку, нирок, легень) за методом О.О.Васильєвої з урахуванням морфологічних особливостей органів трупа, наважки органу, часу і температури зберігання об'єктів дослідження.

Проведення наведених методик аналізу пов'язано з певними труднощами, зокрема трудомісткістю і довготривалістю процесу отримання мічених речовин, необхідністю мати апаратуру для аналізу радіоактивних ізотопів, яка

© О.О.Маміна, В.В.Болотов, 2006