

УДК: 54.062:543.42.062:577.175.822

© Блажеєвський М.Є., Криськів Л.С., 2012

КІНЕТИКО-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АЦЕТИЛХОЛІНУ**Блажеєвський М.Є., Криськів Л.С.***Національний фармацевтичний університет, м. Харків*

Ацетилхолін (*син.* Ацетилхоліну хлорид, Ацеколін, Міохол, Цитохолін і ін.) (АХ), 2-(ацетилокси)-N,N,N-триметилетанаміну хлорид – естер ацетатної кислоти і алкоголю холіну є медіатором центральної та периферичної нервової систем [1]. Його застосовують у медичній практиці при здійсненні операцій на рогівці ока [2], як парасимпатоміметичний засіб при спазмах артерій сітківки, при атонії кишківника і сечового міхура та деяких видах тахікардії. Уводять підшкірно та внутрішньом'язово по 0,05-0,1 г. Форма випуску: по 0,2 г в ампулах ємкістю 5 мл в упаковці по 10 штук [1].

Європейська фармакопея рекомендує вміст основної речовини у субстанції визначати ацидиметрично (зворотнє титрування) у присутності індикатора фенолфталеїну [3].

У науковій літературі описані методики кількісного визначення АХ з використанням різноманітних фізико-хімічних методів: потенціометрії [4], амперометрії [5], спектрофотометрії [6] та флуориметрії [7]. Зараз для кількісного визначення АХ у біологічних рідинах найчастіше користуються методом ВЕРХ з електрохімічним детектором і хромато-маспектрометрією [8].

Заслугує на увагу кінетична методика кількісного визначення АХ, яка ґрунтується на використанні як індикаторної реакції окиснення *п*-фенетидину гідроген пероксидом [9].

Мета роботи. Опрацювати нову методику кількісного визначення АХ в субстанції кінетико-спектрофотометричним методом, яка ґрунтується на використанні реакції окиснення 3,3',5,5' тетраметилбензидину (ТМБ) гідроген пероксидом як індикаторної на АХ.

Використання у якості хромогенного субстрату ТМБ обумовлене його комерційною доступністю, задовільною розчинністю, достатньою селективністю до пероксикарбонівих кислот, а також стійкістю під час зберігання та застосування та безпечністю для персоналу (на відміну від використовуваних раніше канцерогенних бензидину та одіанізидину).

В основі запропонованого кінетико-спектрофотометричного методу кількісного визначення АХ покладено систему двох послідовних реакцій: утворення в результаті пергідролізу АХ (реакція з H_2O_2) надацетатної кислоти (НАК), а відтак взаємодія її з індикаторною речовиною ТМБ з утворенням забарвленого продукту – 3,3',5,5' тетраметилдифенохінондіміну (діаміну ТМБ), ($\lambda_{max} = 450$ нм, $\epsilon = 59000$, рН 5,0), за світловбиранням якого і здійснюють визначення.

Матеріали та методи дослідження. *Реагенти:* Використовували реагенти кваліфікації ч.д.а., двічі дистильовану воду. ТМБ (3,3',5,5' тет-

раметилбензидину дигідрохлориду гідрат) 97%, (ALDRICH, Німеччина), спирт етиловий 96% (Дубов'язівський спиртовий завод, Україна), 30% розчин гідроген пероксиду кваліфікації ч.д.а. Для створення та підтримання необхідного рН використовували 0,2 М фосфатні буферні розчини виготовлені за Гріном [10].

Для досліджень використовували субстанцію ацетилхоліну гідрохлориду фармакопейної чистоти (2-(ацетилокси)-N,N,N-триметилетанаміну хлорид), сухий стерильний порошок у флаконах, вміст основної речовини за даними методу ацидиметрії $w=0,985\%$; ($w(H_2O)=1\%$, 1 флакон містить 0,2 г ацетилхоліну гідрохлориду [11].

Приготування робочого розчину ТМБ $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Наважку 0,313 г ТМБ розчиняли у мірній колбі на 100 мл у 50 мл спирту етилового 96%, доводили до позначки двічі дистильованою водою при 20°C та ретельно збовтували.

Приготування розчину робочого стандартного зразку (РСЗ) АХ (0,182 мг/мл) $1,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Точну наважку 0,1844 г АХ розчиняли в мірній колбі на 100 мл, доводили до позначки двічі дистильованою водою при 20°C та ретельно збовтували. За допомогою піпетки відбирали 10 мл одержаного розчину та переносили у мірну колбу на 100 мл, об'єм доводили до позначки двічі дистильованою водою при 20°C та ретельно збовтували.

Апаратура: Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, ССРСР) у кюветі з товщиною вбираючого шару $l=3$ см. Водневий показник розчинів контролювали за допомогою скляного електроду типу ЭСЛ 43-07 (електрод порівняння – насичений калій хлоридом аргентумхлоридний електрод типу ЭВЛ-1М3.1 на лабораторному іонімірі И-130 (НПО „Аналітприбор”). Термостат УТУ-2 (Zeamit, Польща).

Методика отримання даних для побудови градувального графіка: У мірну колбу на 25 мл послідовно вносять 10,0 мл 0,2 моль/л фосфатного буферного розчину (рН = 8,5), 3,0 мл C_2H_5OH 96%, від 0,5 до 2,5 мл 0,18 мг/мл розчину РСЗ АХ, 6,0 мл $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л розчину ТМБ, 0,5 мл 5,6 моль/л H_2O_2 , доводять двічі дистильованою водою до позначки, ретельно перемішують одержаний розчин впродовж 30 с. Одержану суміш продовжують термостатувати при 35°C. Через 15 хв вимірюють оптичну густину одержаного розчину при 420 нм, використовуючи як компенсаційний розчин сліпого досліджу (без випробуваної речовини) та кювету з товщиною вбираючого шару 30 мм. Розчини перед зливанням термостатують при 35°C не менше 25-30 хв, час фіксують секундоміром з моменту змішування розчинів.

Результати дослідження та їх обговорення. Установлено, що в інтервалі рН 6,86-9,5 швидкість

утворення продукту реакції – діміну ТМБ прямо пропорційна концентрації АХ. Початкова стадія реакції – пергідроліз АХ – є лімітуючою стадією усього процесу і з максимальною швидкістю перебігає в межах рН 8,2 - 8,5. Це значення величини рН є оптимальним і для окиснення утвореною надацетатною кислотою ТМБ.

Концентраційна залежність світлопоглинання розчинів продукту реакції пергідролізу та пероксикислотного окиснення ТМБ за 15 хв наведена на рис. 1. Рівняння графіку має вигляд $A_{15} = (9,75 \pm 0,66) \cdot 10^2 c$ (коефіцієнт $r=0,998$), де c – молярна концентрація, моль/л. Як видно, лінійна залежність зберігається в інтервалі концентрацій АХ від $2 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

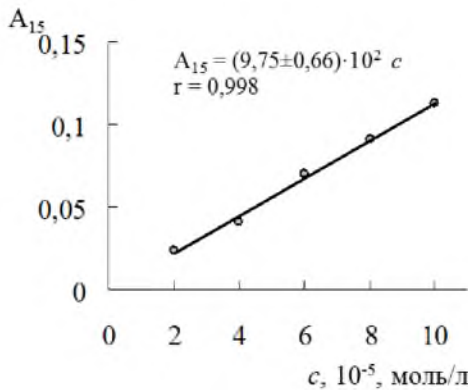


Рис. 1. Залежність світлопоглинання розчинів утвореного продукту ($\lambda=420$ нм) за 15 хв (A_{15}) у системі ТМБ- H_2O_2 -АХ від концентрації ацетилхоліну. c (ТМБ) = $1,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л; c (H_2O_2) = 0,11 моль/л; ϕ (C_2H_5OH) = 32,0%; рН = 8,5. $T = 308$ К.

Хімізм процесів пергідролізу АХ та пероксикислотного окиснення ТМБ наведений на рис. 2.

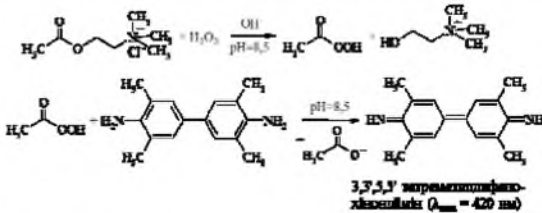


Рис. 2. Схема реакцій пергідролізу ацетилхоліну та пероксикислотного окиснення ТМБ.

Виявлені кінетичні особливості перебігу реакцій у поєднанні з достатньо високою селективністю індикаторної реакції на НАК з ТМБ в присутності відносно великого надлишку гідроген пероксиду покладені в основу розробленої нами методики кількісного визначення мікрограмових кількостей АХ у водно-спиртових розчинах кінетичним методом фіксованого часу.

Методика кількісного визначення вмісту основної речовини у субстанції лікарської речовини АХ: Близько 0,02 г (точна наважка) РСЗ субстанції АХ розчиняють в мірній колбі на 100 мл, доводять до позначки двічі дистильованою водою при 20°C та ретельно збовтують. Розчин термостатують при 35°C не менше 25-30 хв. У мірну колбу на 25 мл

послідовно вносять термостатовані при 35°C розчини: 10,0 мл 0,2 моль/л фосфатного буферного розчину (рН = 8,5), 3,0 мл C_2H_5OH 96%, 2,0 мл досліджуваного розчину АХ, 6,0 мл $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л розчину ТМБ, 0,5 мл 5,6 моль/л H_2O_2 , вмикають секундомір, доводять двічі дистильованою водою до позначки, ретельно перемішують. Одержану суміш продовжують термостатувати при 35°C. Через 15 хв вимірюють оптичну густину одержаного розчину при 420 нм, використовуючи як компенсаційний розчин сліпого досліду (без випробуваної речовини) та кювету з товщиною вбираючого шару 30 мм. Аналогічно виконують визначення з $1,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчином РСЗ.

Вміст основної речовини w (масова частка) у перерахунку на суху речовину $C_7H_{16}ClNO_2$, у %, обчислюють за формулою:

$$w = \frac{C \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100\%}{1000 \cdot m_H \cdot (100 - w(H_2O))}$$

де C – концентрація АХ, мг/мл, знайдена методом стандарту за формулою:

$$C = \frac{C_{cm} \cdot A}{A_{cm}}$$

m_H – маса наважки субстанції, г;

$w(H_2O)$ – вміст води, встановлений експериментально за втратою вологи фармакопейним методом, %.

Вміст АХ у модельних розчинах та розчині випробуваної субстанції ацетилхоліну знаходили за методом стандарту. Отримані дані обробляли за рекомендаціями ДФУ з використанням методів математичної статистики пакету статистичних програм Microsoft Excel. Результати кількісного визначення АХ у модельних розчинах наведені в таблиці. Нижня межа визначуваних концентрацій АХ становить $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л. При визначенні $4,00 \cdot 10^{-5}$ та $8,00 \cdot 10^{-5}$ моль/л АХ RSD становить 2,89% та 2,02% відповідно ($n=5$, $P=0,95$). Вміст основної речовини у випробуваній субстанції АХ становив $98,8 \pm 2,5\%$.

Таблиця: Метрологічні характеристики результатів кінетичного визначення ацетилхоліну у модельних розчинах ($n=5$, $P=0,95$)

Взято, моль/л	Знайдено, моль/л	Метрологічні характеристики
$4,00 \cdot 10^{-5}$	$4,14 \cdot 10^{-5}$	$\bar{x} = 4,00 \cdot 10^{-5}$ $S = \pm 1,15 \cdot 10^{-6}$ $S_{\bar{x}} = \pm 5,16 \cdot 10^{-7}$ $\Delta \bar{X} = \pm 1,43 \cdot 10^{-6}$ $RSD = \pm 2,89\%$ $\varepsilon = 3,59\%$; $\delta = 0\%$
	$4,04 \cdot 10^{-5}$	
	$4,04 \cdot 10^{-5}$	
	$3,93 \cdot 10^{-5}$	
	$3,84 \cdot 10^{-5}$	
$8,00 \cdot 10^{-5}$	$7,90 \cdot 10^{-5}$	$\bar{x} = 7,90 \cdot 10^{-5}$ $S = \pm 1,60 \cdot 10^{-6}$ $S_{\bar{x}} = \pm 7,14 \cdot 10^{-7}$ $\Delta \bar{X} = \pm 1,99 \cdot 10^{-6}$ $RSD = \pm 2,02\%$ $\varepsilon = 2,51\%$; $\delta = -1,28\%$
	$8,00 \cdot 10^{-5}$	
	$8,10 \cdot 10^{-5}$	
	$7,70 \cdot 10^{-5}$	
	$7,79 \cdot 10^{-5}$	

Перевагами опрацьованої методики, які вигідно відрізняють її від відомих, є можливість визначення значно менших кількостей аналіту, ніж

фармакопейним методом [3] чи аргентометрією за Фольгардом [11], простота виконання, експресність, задовільна відтворюваність та правильність результатів. Вона не вимагає використання токсичних розчинників, складного апаратурного оснащення та є швидкою у виконанні.

Висновки: Опрацьована нова кінетико-спектрофотометрична методика та показана мо-

жливність кількісного визначення АХ у модельних розчинах та субстанції за допомогою індикаторної реакції окиснення ТМБ гідроген пероксидом у водно-спиртових розчинах. Методика характеризується задовільною відтворюваністю та правильністю ($RSD \leq 2,89$, $\delta \leq -1,28$). Вміст основної речовини у випробуваній субстанції АХ $98,8 \pm 2,5\%$.

ЛІТЕРАТУРА:

1. **Машковский М. Д.** Лекарственные средства: В 2 т. Т. 1.–14-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна, 2002.–540 с.
2. **Daly R.** Вариант упрощенной фиксации интраокулярной линзы / Daly R. // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2009. – №4. – С. 38-39.
3. European Pharmacopoeia. – 5th ed. – Strasbourg: European department for the Quality of Medicines, 2005. – 1099 p.
4. **Górska L.** Metalloporphyrin-based acetate-selective electrodes as detectors for enzymatic acetylcholine determination in flow-injection analysis system / Górska L., Mroczkiewicz M., Pietrzaka M. et al // Anal. Chim. Acta. – 2009. – Vol. 644, №1–2. – P. 30-35.
5. **Helia H.** Copper nanoparticles-modified carbon paste transducer as a biosensor for determination of acetylcholine / Helia H., Hajjizadeh M., Jabbarib A. et al // Biosensors and Bioelectronics. – 2009. – Vol. 24, №8. – P. 2328-2333.
6. **Raucha P.** A chemiluminescent flow sensing device for determination of choline and phospholipase D activity in biological samples / Raucha P., Ferrib E. N., Girotti S. et al // Anal. Biochem. – 1997. – Vol. 245, №2. – P. – 133-140.
7. **Ričný J.** Determination of acetylcholine and choline by flow-injection with immobilized enzymes and fluorometric or luminometric detection / Ričný J., Coupeka J., Tučeka S. // Anal. Biochem. – 1989. – Vol. 176, № 2. – P. 221-227.
8. **Al-Badr Abdullah A.** Acetylcholine Chloride: analytical profile / Abdullah A. Al-Badr, Humeida A. El-Obeid // Profiles of drug substances, excipients and related methodology. – 2005. – Vol. 31. – P. 21-115.
9. **Блажесевський М. Є.** Кінетичний метод визначення ацетилхоліну / Блажесевський М. Є. // Вісник фармації. – 2002. – Том 2, № 30. – С. 110-113.
10. **Лазарев А.И.** Справочник химика-аналитика / А.И. Лазарев, И.П. Харламов, П.Я. Яковлев, Е.Ф. Яковлева. – М.: Металлургия, 1976. – 184 с.
11. **ФС 42-1479-80.** Ацетилхолин-хлорид 0,1 и 0,2 для инъекций.

Блажесевський М.Є., Криськів Л.С. Кінетико-спектрофотометричне визначення ацетилхоліну // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 31-33.

Опрацьована методика та показана можливість кількісного визначення ацетилхоліну (АХ) у модельних розчинах та субстанції кінетико-спектрофотометричним методом за індикаторною реакцією каталітичного окиснення 3,3',5,5'-тетраметилбензидину гідроген пероксидом при рН 8,5. Градувальний графік на АХ лінійний в межах $(2-10) \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ з нижньою межею визначення $c_n = 2,0 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ АХ. Для п'ятиразових визначень $4 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ і $8 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ АХ RSD=2,88% та 2,02% відповідно. Вміст основної речовини у випробуваній субстанції АХ $98,8 \pm 2,5\%$. Перевагами новоопрацьованої методики, які вигідно відрізняють її від відомих, є вища чутливість, простота у виконанні та експресність.

Ключові слова: ацетилхолін, пергідроліз, спектрофотометрія, кількісне визначення.

Блажеевский Н.Е., Крыськив Л.С. Кинетико-спектрофотометрическое определение ацетилхолина // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 31-33.

Разработана методика и показана возможность количественного определения ацетилхолина (АХ) в модельных растворах и субстанции кинетико-спектрофотометрическим методом с использованием индикаторной реакции каталитического окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина пероксидом водорода при рН 8,5. Градуировочный график на АХ линейный в пределах $(2-10) \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ с $c_n = 2 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ АХ. Для пятикратных определений $4 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ и $8 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ АХ RSD 2,89% и 2,02% соответственно. Преимуществами разработанной методики, которые выгодно отличают ее от известных, являются высокая чувствительность, простота и экспрессность. Содержание основного вещества в исследуемой субстанции АХ $98,8 \pm 2,5\%$.

Ключевые слова: ацетилхолин, пергидролиз, спектрофотометрия, количественное определение.

Blazhejevskyy M.Ye., Kryskiw L.S. Acetylcholine kinetic spectrophotometric assay // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 31-33.

A kinetic spectrophotometric method has been developed for the determination of Acetylcholine Chloride (ACh) using the indicator reaction of catalytic 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine oxidation by hydrogen peroxide at рН 8,5 in model solutions and pure substance. Calibration graph for ACh has linear dependence in the range $20-100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ with a limit of quantitation (LOQ) of $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ACh. For five determinations of $40 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ and $80 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ACh the reproducibility has a relative S. D. of 2.89% and 2.02% respectively. The proposed method is more sensitive, simple and expresses in comparance with the well-known one. ACh substance contains $98,8 \pm 2,5\%$ of $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{ClNO}_2$.

Key words: acetylcholine, perhydrolysis, spectrophotometric assay.

Надійшла 17.03.2012 р.

Рецензент: проф. Л.В.Савченко