

Рекомендована д.ф.н., професором В.С.Бондарем

УДК 543.866: 543.066:577.175.822

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДЕКАМЕТОКСИНУ У ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ ЕНЗИМНО-КІНЕТИЧНИМ МЕТОДОМ

М.Є.Блажеєвський, С.А.Карпушина, В.І.Степаненко, С.В.Баюрка

Національний фармацевтичний університет

Опрацьований новий ензимно-кінетичний метод кількісного визначення декаметоксину (ДМ) в таблетках "Септефрил" по 0,0002 г, який ґрунтується на ефекті інгібування ДМ реакції ензимного (у присутності ферменту холіноестерази) гідролізу субстрату ацетилхоліну. Порівняння між собою ступенів інгібування реакції в присутності проби препарату та РСЗ ДМ дозволяє знаходити вміст ДМ у лікарській формі. Як індикаторна реакція на ацетилхолін використана реакція окиснення п-анізидину надацетатною кислотою, утвореною в допоміжній реакції пергідролізу ацетилхоліну. При визначенні 1-2 мкг/мл інгібітора $s_T \leq 6\%$. Нижня межа визначуваної концентрації, яка відповідає 20% інгібування реакції, становить 1 нг/мл.

Декаметоксин-[1,10-декаметилен-біс-N-диметил(карбметоксиметил)-амонію] дихлорид (ДМ) належить до катіонних поверхнево-активних антимікробних та антисептичних препаратів [6, 10]. Йому притаманна відносно висока специфічна біологічна активність [15], що обумовлює широке застосування препарату у вигляді достатньо розбавлених розчинів у медичній практиці, а тому опрацювання високочутливих та вибіркового методик кількісного визначення ДМ становить неабиякий практичний інтерес. Широковживані в теперішній час аналітичні методики екстракційно-спектрофотометричного [8, 12], іонометричного [2, 3, 4, 5, 11] та мікробіологічного [6, 9] визначення ДМ є трудомісткими, складними і не завжди достатньо чутливими [14].

Робота присвячена опрацюванню нової високочутливої та водночас достатньо селективної методики ензимно-кінетичного визначення ДМ в таблетках для розсмоктування у порожнині рота "Септефрил" по 0,0002 г виробництва Борщагівського хімфармзаводу, сер. 591200 (Україна), яка ґрунтується на ефекті інгібування ДМ реакції ензимного (у присутності ферменту холіноестерази) гідролізу субстрату ацетилхоліну. Порівняння між собою ступенів інгібування реакції в присутності проби препарату та РСЗ ДМ дозволяє знаходити

вміст ДМ в лікарській формі. Для визначення протихолінестеразної активності ДМ використували запропонований нами раніше кінетичний метод [1]. Як стандартний зразок використовували декаметоксин-порошок (субстанцію) Дослідного виробництва Інституту органічної хімії НАН України, Київ (Україна). Як індикаторна реакція на ацетилхолін нами використана реакція окиснення п-анізидину надацетатною кислотою, утвореною в допоміжній реакції пергідролізу ацетилхоліну.

Швидкість індикаторної реакції характеризують тангенсом кута нахилу прямолінійної ділянки кінетичної кривої ($tq \alpha$) в координатах оптична густина продукту окиснення п-анізидину (A_{358}) — час (τ) [13].

Контрольний дослід (на реактиви) виконують аналогічно, але замість аліквотної частини досліджуваного розчину інгібітора використовують двічі перегнану воду.

Виходячи із одержаних даних, розраховують ступінь інгібування як відношення різниці тангенсів нахилу кінетичної кривої досліді з пробою і кривої контрольного досліді до різниці тангенсів нахилу кінетичної кривої на вихідний вміст субстрату і кривої контрольного досліді.

Приготування розчину робочого стандартного зразка (РСЗ) декаметоксину. Біля 0,05 г декаметоксину субстанції (точна наважка), що відповідає вимогам чинної фармакопейної статті, в перерахунку на суху речовину переносять у мірну колбу на 50 мл, додають 200 мл води, збовтують до повного розчинення, після чого доводять об'єм водою до позначки і перемішують (основний розчин), 10,00 мл основного розчину переносять у мірну колбу на 500 мл, доводять об'єм водою до позначки і ретельно перемішують, при цьому 1 мл одержаного розчину містить 20 мкг декаметоксину.

Приготування розчину субстрату ферментної реакції ацетилхоліну. Вміст ампули фармакопейного препарату ацетилхоліну гідрохлориду (по 0,02 г) розчиняли у 10 мл двічі дистильованої води. Реактиви зберігали в холодильнику. Придатні протягом 6-7 діб (через гігроскопічність цієї речовини відкриту ампулу з ацетилхоліном гідрохлоридом

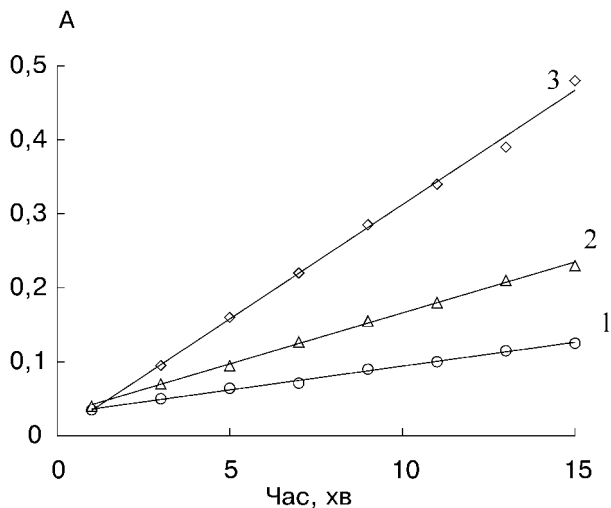


Рис. Кінетичні криві спряженого окиснення n-анізидину гідроген пероксидом у присутності ACh+ChE (1), суміші ACh+(ChE+Inh) (2) та ACh (3). C(Ach)= 0,02%; C(H₂O₂) = 0,05%; AChE = 10 од./кювету; C(ДМ)=1,0 мкг/мл (Inh); C(n-анізидину)=0,05%.

тримають в ексікаторі з хлоридом кальцію в холодильнику).

Приготування розчину ферменту холінестерази, 200 АО/мл: розчиняли вміст флакону (80 мг) ацилгидролази сироватки крові коня К.Ф.3.1.1.8 (НВО "Биомед", Росія) VI кл. активністю 25 АО/мг у 10 мл двічі дистильованої води при 38°C.

Приготування фосфатного буферного розчину з рН 8,4. 35,8 г двозаміщеного фосфату натрію (Na₂HPO₄ · 12H₂O) розчиняли в 500 мл води та додавали до нього 19 мл 0,1 М HCl до рН 8,4. Значення рН контролювали потенціометрично.

Розчин гідроген пероксиду, 5%. Одержували шляхом відповідного розбавлення пергідролу марки осч. бідистиліят. Вміст гідроген пероксиду у пергідролі та розчині готовому до застосування контролювали перманганатометрично [7].

Розчин n-анізидину, 0,5%. 0,5 г n-анізидину гідрохлориду чда., очищеного перекристалізацією з етанолу ректифікату з додаванням активованого вугілля, розчиняли у двічі дистильованій воді у мірній колбі на 100 мл і доводили об'єм розчинів водою до позначки.

Методика кількісного визначення декаметоксину в таблетках "Септефрил" (по 0,0002 г). Зважену з точністю до ±0,0001 г таблетку в агатовій ступці ретельно подрібнювали, додавали 4 мл 96% етанолу, перемішували впродовж 2 хв скляною паличкою і одержану суспензію переносили у центрифужну пробірку. Центрифугували впродовж 2 хв з частотою 3000 об/хв. Надосадову рідину переносили у мірну колбу на 10 мл. Залишок у ступці тричі споліскували 2 мл 96% етанолу. Надосадову рідину переносили до тієї ж мірної колби, довели об'єм розчину 96% етанолом до позначки і перемішували. 1,00 мл одержаного розчину (або РСЗ декаметоксину 20 мкг/мл) переносили у градуйовану пробірку, додавали 5,0 мл 0,2 моль/л

фосфатного розчину (рН 8,4), 1,0 мл розчину ферменту холінестерази та інкубували впродовж 10 хв при +38°C. Потім додавали 1,0 мл 0,2% розчину ацетилхоліну, ретельно перемішували і ще витримували впродовж 20 хв, а відтак до суміші приливали 1,0 мл 5% розчину гідроген пероксиду, знову інкубували 10 хв і при перемішуванні додавали 1,0 мл 0,5% розчину n-анізидину. Вмикали секундомір і через кожну хвилину вимірювали світловбирання одержаного розчину на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 358 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Крім того, додатково проводили ще два контрольних досліди. До градуйованої пробірки вносили послідовно 6,0 мл 0,2 моль/л фосфатного розчину (рН 8,4), 1,0 мл 96% етанолу, 1,0 мл 0,2% розчину ацетилхоліну, 1,0 мл 5% розчину гідроген пероксиду, суміш перемішували та інкубували протягом 10 хв при +38°C. Після цього додавали 1,0 мл 0,5% розчину n-анізидину і знову перемішували суміш. Вмикали секундомір, починаючи відлік часу, і через кожну хвилину вимірювали світловбирання одержаного розчину на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 358 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували розчин буферної суміші.

До іншої градуйованої пробірки послідовно вносили 6,0 мл 0,2 моль/л фосфатного розчину (рН 8,4), 1,0 мл 96% етанолу, 1,0 мл 0,2% розчину ацетилхоліну, 1,0 мл розчину ферменту холінестерази та інкубували впродовж 20 хв при +38°C. Потім додавали 1,0 мл 5% розчину гідроген пероксиду, перемішували та знову інкубували суміш на протязі 10 хв при +38°C. Після цього до одержаної суміші додавали при перемішуванні 1,0 мл 0,5% розчину n-анізидину, вмикали секундомір і через кожну хвилину вимірювали світловбирання розчину на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 358 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння розчин буферної суміші.

Вміст декаметоксину в одній таблетці в грамах (X) розраховували за формулою:

$$X = \frac{I \cdot m_0 \cdot \bar{m} \cdot 10}{I_0 \cdot m_H \cdot 500 \cdot 5},$$

де: I — ступінь інгібування реакції у робочому досліді з пробією, %;

I₀ — ступінь інгібування реакції у досліді з розчином РСЗ декаметоксину, %;

m₀ — маса наважки РСЗ декаметоксину, г;

500 — об'єм мірної колби, в якій виготовляли розчин РСЗ декаметоксину, мл;

5 і 10 — коефіцієнт розбавлення;

m_H — маса наважки порошку таблеток декаметоксину, г;

m — середня маса однієї таблетки декаметоксину, г.

Ступінь інгібування розраховували за формулою:

$$I = \frac{tg \alpha - tg \alpha_{\phi}}{tg \alpha_{\max} - tg \alpha_{\phi}} 100\%,$$

де: $tg \alpha$ — нахил кінетичної кривої для реакції в присутності інгібітора, xv^{-1} ;

$tg \alpha_{\phi}$ — нахил кінетичної кривої для реакції за відсутності інгібітора, xv^{-1} ;

$tg \alpha_{\max}$ — нахил кінетичної кривої для реакції окиснення п-анізидину в суміші з гідроген пероксидом у присутності невитраченого у ферментній реакції субстрату ацетилхоліну, xv^{-1} .

Рівняння залежності ступеня інгібування ферментної реакції гідролізу ацетилхоліну від концентрації ДМ мало лінійний вигляд: $I (\%) = 9,1 \pm 8,1 (r=0,99)$, де C у ng/ml . Як приклад, на рис. наве-

дені кінетичні криві, одержані при виконанні аналізу запропонованим методом модельної суміші.

Такий характер залежності ступеня інгібування від концентрації інгібітора реакції дозволяє для знаходження вмісту ДМ у препараті використовувати метод стандарту. Методом “уведено-знайдено” доведена правильність одержуваних результатів аналізу ($\beta \leq 3\%$). При визначенні 1-2 mg/ml інгібітора $s_r \leq 6\%$. Нижня межа визначуваної концентрації, яка відповідає 20% інгібування реакції, становить 1 ng/ml кінцевого об'єму.

ВИСНОВОК

Запропонований новий ензимно-кінетичний метод кількісного визначення декаметоксину в таблетках “Септефрил” по 0,0002 г. При визначенні 1 mg/ml декаметоксину $s_r \leq 6\%$.

ЛІТЕРАТУРА

1. Блажеевский Н.Е. Аналитика и аналитики: Катал. рефератов и статей Международ. форума в 2-х томах (2-6 июня 2003 г., г. Воронеж, Россия), Т. 2 / Под ред. Я.И.Коренмана. — Воронеж.: Изд-во Воронеж. гос. технол. акад., 2003. — С. 431.
2. Болотов В.В., Зареченський М.А., Кобзар Г.Л. // Вісник фармації. — №4 (36). — 2003. — С. 30-33.
3. Егоров В.В., Репин В.А., Капуцкий В.Е. // Журн. аналит. химии. — 1996. — Т. 51, №10. — С. 1080-1082.
4. Зареченський М.А., Болотов В.В., Кобзар Г.Л. // Тез. докл. Всеукр. наук.-практ. конф. “Вчені України — вітчизняній фармації”. — Х., 2000. — С. 195-197.
5. Інформ. лист №2 — 2004 / В.В.Болотов, Г.Л.Кобзар, М.А.Зареченський. — К., 2003. — Вип. №5 за проблемі “Фармація”. — 8 с.
6. Красильников А.П. Справочник по антисептике. — Мн.: Высш. шк., 1995. — 376 с.
7. Луцевич Д.Д., Мороз А.С., Рибальська О.В., Огурцов В.В. Аналітична хімія. — К.: Здоров'я, 2003. — 196 с.
8. Марьянчик И.В., Шерстюк Р.А., Молдавер Б.П. // Хим.-фармац. журн. — 2000. — Т. 31, №8. — С. 48-49.
9. Навашин С.М., Фомина И.П. Справочник по антибиотикам. — М.: Медицина, 1984. — С. 46.
10. Палій Г.К. Антисептики у профілактиці і лікуванні інфекцій. — К.: Здоров'я, 1997. — 201 с.
11. Пат. 65965 А Україна, МКІ¹ G 01 N 27/333, №20033076338. — Заявл.: 08.07.2003. Опубл.: 15.04.2004. — Бюл. №4. — 3 с.
12. Таблетки “Септефрил”. ВФС 42У-37-97.
13. Фадеева В.И., Шеховцова Т.Н., Иванов В.М. и др. Основы аналитической химии. Практическое руководство: Учеб. пособ. для вузов / Под ред. Ю.А.Золотова. — М.: Высш. шк., 2001. — 463 с.
14. David Harvey. Modern Analytical Chemistry. — Mc Graw-Hill Higher Education, 2000. — 798 p.
15. Drug Evaluation Annual 1994. — American Medical Association, 1994. — 2364 p.

УДК 543.866: 543.066:577.175.822

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕКАМЕТОКСИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ ЭНЗИМНО-КИНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Н.Е.Блажеевский, С.А.Карпушина, В.И.Степаненко, С.В.Баюрка
Разработан новый энзимно-кинетический метод количественного определения декаметоксина (ДМ) в таблетках “Септефрил” по 0,0002 г, который основывается на эффекте ингибирования ДМ реакции энзимного (в присутствии фермента холинэстеразы) гидролиза субстрата ацетилхолина. Сравнение между собой степеней ингибирования реакции в присутствии пробы препарата и РСО ДМ позволяет находить содержание ДМ в лекарственной форме. В качестве индикаторной реакции на ацетилхолин использована реакция окисления п-анізидина надацетатной кислотой, образующейся во вспомогательной реакции пергидролиза ацетилхолина. При определении 1-2 mg/ml декаметоксина $s_r \leq 6\%$. Нижняя граница определяемой концентрации, соответствующей 20% ингибирования реакции, составляет 1 ng/ml .

UDC 543.866: 543.066:577.175.822

QUANTITATION OF DECAMETHOXINE IN DRUGS BY ENZYMATIC-KINETIC METHOD

N.Ye.Blazheevsky, S.A.Karpushina, V.I.Stepanenko, S.V.Bayurka
A new enzymatic-kinetic method of decamethoxine quantitation (DM) in pills Septefril by 0,0002 g based on the inhibition effect of the reaction of enzymatic (in the presence of cholinesterase enzyme) hydrolysis of acetylcholine by DM has been developed. Comparison of the inhibition degrees of the reaction in the presence of test of the preparation and SSS of DM allows to find maintenance of DM in a drug. As an indicator reaction for acetylcholine the reaction of oxidation of p-anisidine by peracetic acid formed in the auxiliary reaction of acetylcholine perhydrolysis has been used. Under the determination of 1-2 g/ml of decamethoxine $s_r \leq 6\%$. The lower limit of the tested concentration, corresponding to 20% of the reaction inhibition, is 1 ng/ml .