

Рекомендована д.х.н., професором В.В.Болотовим

УДК 615.212.073:535.379

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ НІМЕСУЛІДУ ЗА ЕФЕКТОМ ІНГІБУВАННЯ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНОЇ РЕАКЦІЇ

І.О.Юрченко, М.Є.Блажеєвський, В.П.Буряк

Запорізький державний медичний університет
Національний фармацевтичний університет

Німесулід (N-(4-нітро-2-феноксиfenіл)метан-сульфонамід) — відносно новий препарат з групи нестероїдних протизапальних засобів, селективний інгібітор ферменту запалення циклооксигенази-2. Він широко застосовується для лікування артриту, бурситу, подагри, тендиніту, бульового синдрому різної етіології, гарячки при інфекційно-запальніх процесах. Для визначення німесуліду широко використовують різноманітні інструментальні методи (спектрофотометрія УФ-та у видимій ділянці спектра, ГРХ та ВЕРХ тощо). Основний їх недолік — необхідність використання дорогого обладнання та реагентів. Хемілюмінесцентний метод аналізу знаходить широке використання для кількісного визначення різноманітних сполук, характеризується простотою у виконанні та широким інтервалом визначуваних концентрацій. Дані щодо визначення німесуліду методом хемілюмінесценції у науковій літературі відсутні. Нами розроблені методики кількісного визначення німесуліду у розчинах субстанції за ефектом інгібування хемілюмінесцентної реакції окиснення люмінолу гідрогену пероксидом у присутності геміну. Результати показали високу чутливість ($C_h = 1 \text{ мкг/мл}$), $RSD \leq 4,1\%$, що свідчить про перспективність застосування даного методу аналізу у практиці контролюно-аналітичних та судово-токсикологічних лабораторій.

Німесулід (німесил, німулід, наїз) — нестероїдний протизапальний засіб (НПЗЗ) із жарознижувальною, протизапальною та аналгетичною дією був розроблений в Італії ще в 1985 р. Німесулід займає значну частку ринку НПЗЗ в тих країнах, де він дозволений до медичного застосування. За хімічною будовою згідно з номенклатурою IUPAC німесулід — це N-(4-нітро-2-феноксиfenіл)метансульфонамід.

За майже сорокарічну історію препарату запропонована численна кількість методик кількісного визначення його як у субстанції, так і у різноманітних лікарських формах. Насамперед, це спектрофотометрія у видимій та ультрафіолетовій ділянці спектра. Так, наприклад, Mir Azam Khan та співавтори [9] розробили спектрофотометричну

методику кількісного визначення німесуліду в субстанції та різних лікарських формах на підставі взаємодії продукту кислотного гідролізу з фенолом у присутності натрію нітрату. Абсорбція аналізованих розчинів вимірювалась при 475 нм. Reddy M.Narayana та співавтори [10] рекомендують для визначення німесуліду спектрофотометричний метод аналізу за його реакцією з реагентом Фоліна-Чокалтеу. Абсорбцію забарвлених в блакитний колір розчину вимірюють при $\lambda = 600 \text{ нм}$. За даними K.P.R.Chowdary та співавт. [7] німесулід можна кількісно визначити спектрофотометрично у видимій ділянці спектра двома варіантами. Перший варіант базується на вимірюванні світлопоглинання продукту реакції відновленої форми німесуліду з флороглюцином у присутності кислоти нітратної ($\lambda_{\text{макс}} 415 \text{ нм}$), а другий — на реакції відновленої форми німесуліду з n-диметиламінобензальдегідом ($\lambda_{\text{макс}} 415 \text{ нм}$). Також у науковій літературі зустрічаються методи ВЕРХ, ГРХ тощо [8].

Хемілюмінесцентний метод аналізу [3, 6] знаходить широке застосування для кількісного визначення різноманітних речовин [5, 11]. Однак дані щодо визначення німесуліду методом хемілюмінесценції в науковій літературі відсутні. Разом з тим нами було встановлено, що німесулід помітно гальмує хемілюмінесцентну реакцію каталітичного окиснення люмінолу гідрогену пероксидом у присутності геміну.

Метою даної роботи є дослідження ефекту інгібування німесулідом хемілюмінесцентної реакції окиснення люмінолу гідрогену пероксидом у присутності геміну та розробка методу кількісного визначення німесуліду у водних розчинах субстанції.

Об'єктом дослідження слугував фармакопейний стандартний зразок НПЗЗ німесуліду, наданий нам Державним підприємством “Науково-експертний фармакопейний центр України” (м. Харків). Реагенти та розчинники, що були нами використані при виготовленні розчинів, мали кваліфікацію хімічно чисті (х.ч.) [2, 8, 11].

Матеріали та методи

Для виконання експерименту виготовляли розчин натрію гідроксиду без карбонатів (за Гіллебрантом), 0,1720 моль/л, розчин люмінолу (H_2L),

Таблиця 1

Вплив концентрації німесуліду на хемілюмінесценцію в системі $H_2L-H_2O_2-\text{Нем}$

Концентрація німесуліду, мкг/мл	Максимальна інтенсивність хемілюмінесценції, I_{\max} , ум. од.	$\lg I_{\max}$, ум. од.	Час за $\Delta t_{\text{хл}} = 74\%$, ум. од. (хв)	$\lg \Delta t_{\text{хл}}$, ум. од. (від хв)
0	84	1,92	34,5 (1,44)	1,54 (0,16)
4,0	83	1,915	28 (1,17)	1,45 (0,07)
8,0	82	1,91	21,5 (0,90)	1,33 (-0,05)
12,0	79	1,90	14,5 (0,60)	1,16 (-0,22)
16,0	76	1,89	11,6 (0,48)	1,06 (-0,32)
20,0	61	1,785	8,0 (0,33)	0,9 (-0,48)
24,0	53	1,72	6,5 (0,27)	0,81 (-0,57)
28,0	46	1,66	5,5 (0,23)	0,74 (-0,64)
32,0	33	1,52	3,5 (0,15)	0,54 (-0,82)
36,0	26	1,41	2,5 (0,10)	0,4 (-1,0)

10^{-3} моль/л, розчин геміну (Нем), 1,0 мкг/мл та розчин стандартного зразка німесуліду (РС3). Були використані наступні прилади: установка, зібрана на фотоелектронному помножувачі ФЕУ-84А з високовольтним стабілізатором ВС-22 (800 В) та вимірювачем малих струмів (ИМТ-05). Кінетичні криві ХЛ реєстрували на потенціометрі-самописці Line Recorder TZ4620 (Чехія), $U=1$ В, 6 cm/min; $k = 2 \cdot 10^{-8}$ (ИМТ-05). Розчини змішували у кварцовій кюветі (робочий об'єм — 10 мл). Останній компонент додавали за допомогою піпеткового дозатора П1-0,5 (об'єм 0,50 мл).

Експериментальна частина

Методика кількісного визначення німесуліду методом ХЛ. У кварцову кювету постійно вносили: 3,00 мл 0,1720 моль/л натрію гідроксиду, 1,00 мл 10^{-3} моль/л розчину люмінолу, (10-X) мл двічі дистильованої води (де X — сумарний об'єм усіх реактивів і проби, мл), 0 (контрольний дослід, отримували значення величини максимальної інтенсивності хемілюмінесценції, I_0) — 1,00 мл розчину 40 мг/100 мл німесуліду (робочий дослід, отримували значення величини максимальної інтенсивності хемілюмінесценції, $I_{\text{хл}}$), ретельно перемішували струшуванням, встановлювали кювету у світлонепроникну камеру фотометра, відкривали шторку і вливали 0,50 мл 1,0 мкг/мл розчину геміну. Реєстрували кінетичну криву хемілюмінесцен-

ції. З діаграмами вказаного потенціометра знаходили значення величини максимальної інтенсивності хемілюмінесценції, I_{\max} , а також час (Δt), за який $I_{\text{хл}}$ змениться на 74% від I_0 у контрольному досліді згасання хемілюмінесценції [1, 4].

Для розрахунку концентрації німесуліду в аналізованому розчині методом змінного часу із використанням стандарту застосовували формулу:

$$C_x = \frac{C_{\text{ст}}}{(2 - \lg \Delta t_{\text{ст}})} \times (2 - \lg \Delta t),$$

де: C_x — концентрація аналізованого розчину німесуліду, мкг/мл; $C_{\text{ст}}$ — концентрація стандартного розчину німесуліду, мкг/мл; Δt — час, за який відбувається затухання хемілюмінесценції реакції, хв; $\Delta t_{\text{ст}}$ — час, за який відбувається затухання хемілюмінесценції стандартного розчину німесуліду з відомою концентрацією, хв.

Результати та їх обговорення

Результати вивчення процесу інгібування хемілюмінесценції німесулідом наведені у табл. 1. Вони свідчать про зменшення інтенсивності хемілюмінесценції залежно від концентрації препарату.

Нами було запропоновано здійснювати кількісне визначення німесуліду двома способами, а саме кінетичним методом максимальної інтенсивності та змінного часу. Лінійна залежність на рисунку в

Таблиця 2

Результати кількісного визначення німесуліду за ефектом інгібування методом максимальної інтенсивності хемілюмінесценції

Взято німесуліду, мкг/мл	I_{\max} , ум. од.	Знайдено		Метрологічні характеристики ($P = 0,95$; $n = 7$)
		мкг/мл	%	
21,00	61	21,10	100,69	$\bar{X} = 21,55$ (102,62%)
	60	21,55	102,64	$S = \pm 0,89$
	59	22,00	104,60	$S_X = \pm 0,34$
	62	20,80	98,73	$\Delta X = \pm 0,82$
	58	22,40	106,55	$RSD = 4,1\%$
	63	20,30	96,77	$\varepsilon = \pm 3,8\%$
	57	22,80	108,51	$\delta = +2,6\%$

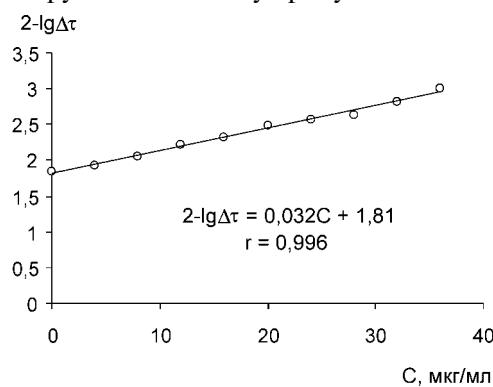


Рис. Градуювальна залежність кількісного визначення німесуліду кінетичним методом змінного часу у модельних розчинах.

Таблиця 3

Результати кількісного визначення німесуліду у модельних розчинах методом змінного часу ($P = 0,95$; $n = 7$)

Взято німесуліду, мкг/мл	$Ig\Delta t$ ($\Delta k_{\text{нл}}=74$)	Знайдено		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
4,000	0,0540	3,938	98,45	$\bar{X} = 3,91$ $(97,75\%)$ $S = \pm 0,14$ $S_x = \pm 0,05$ $\Delta X = \pm 0,13$ $RSD = 3,60\%$ $\epsilon = \pm 3,33\%$ $\delta = -2,25\%$
	0,0508	4,038	100,95	
	0,0475	4,139	103,48	
	0,0572	3,838	95,95	
	0,0588	3,788	94,70	
	0,0556	3,888	97,20	
	0,0604	3,739	93,48	

координатах ($2-Ig\Delta t$) від C зберігалась у інтервалі концентрацій німесуліду від 1 до 36 мкг/мл.

Результати кількісного визначення німесуліду кінетичним методом максимальної інтенсивності хемілюмінесценції та методом змінного часу у модельних розчинах наведені в табл. 2 та 3.

Вони свідчать про можливість одержання достовірних результатів при виконанні аналізу опрацьованим методом хемілюмінесценції. В інтервалі визначуваних концентрацій від 1 до 35 мкг/мл RSD не перевищує 4,1%.

ВИСНОВКИ

Опрацьовані методики кількісного визначення німесуліду методом хемілюмінесценції за ефектом інгібування індикаторної реакції каталітичного окиснення люмінолу гідрогену пероксидом у присутності геміну. В інтервалі визначуваних концентрацій від 1 до 35 мкг/мл RSD не перевищує 4,1%. Розроблені методики можуть бути використані у фармацевтичному та судово-токсикологічному аналізі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Будников Г.К., Зиятдинова Г.К. // Журн. аналит. химии. — 2005. — Т. 60, №7. — С. 678-691.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний центр”. — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с. — Доп. 1. — 2004. — 520 с.
3. Зуй О.В., Гончарук В.В. // Укр. хим. журн. — 2005. — Т. 71, №1. — С. 61-67.
4. Юрченко І.О., Блахєевський М.Є., Буряк В.П. Спосіб кількісного визначення німесуліду / Деклараційний пат. на корисну модель №54870, МПК G 01 N 21/78. Промислова власність. — 2010. — №22.
5. Aly F.A., Alarfatti N.A., Alwarthan A. // Talanta. — 1998. — Vol. 47. — P. 471-478.
6. Chemiluminescence in analytical chemistry / Ed. by A.M.Garcia-Campana, W.R.G.Baeyens. — New York: Marcel Dekker, 2001 — P. 621.
7. Chowdary K.P., Kumar K.G., Rao G.D. // IJPS. — 1999. — Vol. 61 (2). — P. 86-89.
8. European Pharmacopoeia. — 5-th ed. — Strasbourg: European department for the Quality of Medicines, 2005. — 2781 p.
9. Mir A.K., Mohhamad K., Saikh M.W. et al. // Applied Chemistry. — 2007. — Vol. 11, №2. — P. 453-456.
10. Narayana R.M., Sasira R.K., Gowri S.D. et al. // Ind. J. Pharm. Sci. — 1998. — Vol. 60. — P. 172-173.
11. Perju A.C., Mandrescu M., Spac A.F., Dorneanu V. // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. — 1999. — Vol. 111, №2. — P. 535-539.

УДК 615.212.073:535.379

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИМЕСУЛИДА ПО ЭФФЕКТУ ИНГИБИРОВАНИЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ

И.А.Юрченко, М.Е.Блахєевский, В.П.Буряк

Нимесулид (N-(4-нитро-2-феноксифенил) метансульфонамид) — это относительно новый препарат из группы нестероидных противовоспалительных средств, селективный ингибитор фермента воспаления циклооксигеназы-2. Он широко применяется для лечения артрита, бурсита, подагры, тендинита, болевого синдрома различной этиологии, лихорадки при инфекционно-воспалительных процессах. Для определения нимесулида широко применяются различные инструментальные методы (спектрофотометрия УФ- и видимой области спектра, ГЖХ, ВЭЖХ и др.). Основной их недостаток — необходимость применять высокоценное оборудование и реагенты. Хемилюминесцентный метод анализа широко применяется для количественного определения различных химических веществ и характеризуется простотой в исполнении и широким диапазоном исследуемых концентраций. Данные по определению нимесулида методом хемилюминесценции в научной литературе отсутствуют. Нами разработаны методики количественного определения нимесулида в субстанции по эффекту ингибирования хемилюминесцентной реакции окисления люминола в присутствии гемина. Результаты показали достаточно высокую чувствительность, $RSD \leq 4,1\%$, что позволяет говорить о перспективности применения данного метода анализа в практике контрольно-аналитических и судебно-токсикологических лабораторий.

UDC 615.212.073:535.379

QUANTITATIVE DETERMINATION OF NIMESULIDE BY THE INHIBITION EFFECT OF THE CHEMILUMINESCENCE REACTION

I.O.Yurchenko, M.Ye.Blaheyevsky, V.P.Buryak

Nimesulide (N-(4-nitro-2-phenoxyphenyl)methanesulfonamide) is a relatively new medicine from nonsteroidal anti-inflammatory drugs group, a selective inhibitor of inflammatory enzyme cyclooxygenase-2. It is widely used for treatment of arthritis, bursitis, gout, tendonitis, pain syndrome of various etiology and fever during infectious and inflammatory processes. There are different instrumental methods for Nimesulide determination (UV- and visible spectrophotometry, GLC, HPLC, etc.). Their main drawback is the necessity to use very valuable equipment and reagents. The chemiluminescent assay is widely used for the quantitative determination of various chemicals and it is characterized by its simplicity and a wide range of the concentrations analyzed. The data on the Nimesulide determination by chemiluminescence is absent in scientific literature. We have developed the methods for quantitative determination of Nimesulide in the solution of the substance by the inhibition of the chemiluminescence oxidation reaction of luminol in the presence of hemin. The results have shown rather high sensitivity ($LOQ = 1 \mu\text{g}/\text{ml}$, $RSD \leq 4,1\%$), and it allows to speak about the possibility of using this method for analysis in practice of analytical and forensic toxicological laboratories.