

УДК 615.451:615.453:543.06:66.094.3:661.491:547.857.4

Н.Ю. БОНДАРЕНКО, *аспірант*, М.Є. БЛАЖЕСВСЬКИЙ, *канд. хім. наук*,
доцент

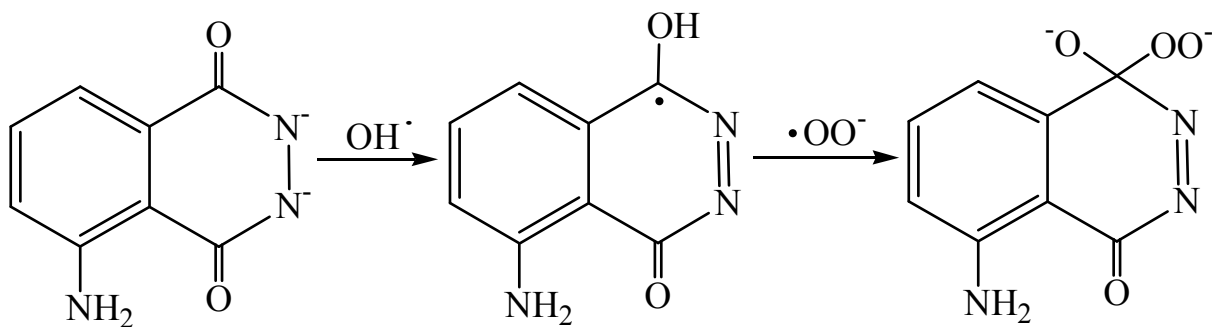
Національний фармацевтичний університет

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КОФЕЇНУ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ В ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ

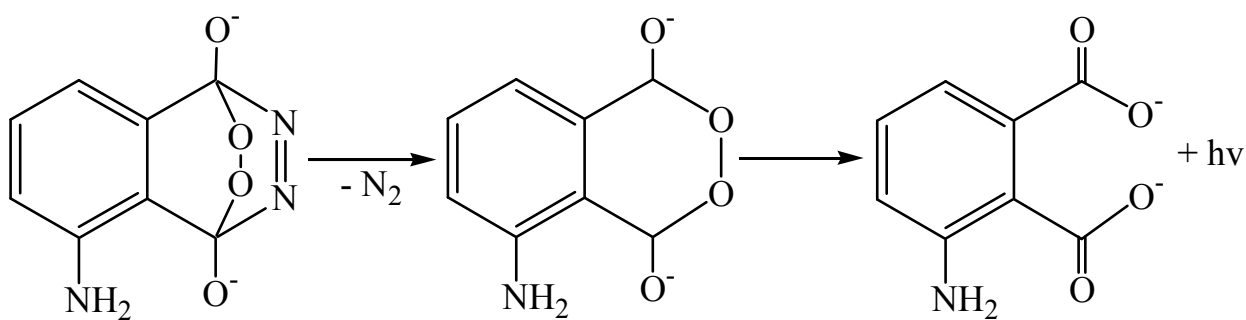
Кофеїн (1,3,7-триметилксантин) (*K*) належить до групи пуринових алкалоїдів похідних ксантину, застосовується в терапевтичній практиці як стимулятор центральної нервової системи та кардіостимулятор [4, 7, 8]. Його випускають у вигляді субстанції, а також подвійної солі кофеїн-бензоату натрію [4]. Для кількісного визначення *K* у теперішній час здебільшого застосовують сучасні фізико-хімічні методи аналізу, а саме УФ-спектроскопію [14, 15, 23], вольтамперометрію [30], капілярний електрофорез [26], газову хроматографію [12, 21, 29], високоефективну рідинну [2, 10, 11, 13, 16 - 20, 22, 28] та міцелярну електрокінетичну [25, 27] хроматографію.

Останнім часом увагу дослідників привертає високочутливий хемілюмінесцентний метод аналізу. Він не вимагає складного апаратного оснащення та особливих умов виконання експерименту, малотривалий, здебільшого вибірковий, чутливий та достатньо точний. Відомо, що більшість ароматичних сполук – нітрофеноли, амінофеноли, аміни, нітроаніліни, нафтоли – інтенсивно гасять хемілюмінесценцію. Висока чутливість хемілюмінесцентної реакції люмінолу до цих інгібіторів дозволила розробити ряд експресних та вельми чутливих методик їх кількісного визначення [6]. Інгібіторна дія алкалоїдів похідних пурину на хемілюмінесценцію в реакції люмінолу з гідроген пероксидом раніше не вивчалась.

У теперішній праці опрацьована методика та досліджена можливість визначення K в лікарських сумішах кінетичним методом за ефектом інгібування хемілюмінесценції системи H_2L (люмінол) – H_2O_2 – Hb (гемоглобін). Згідно сучасних уявлень [24] схема механізму виникнення хемілюмінесценції має вигляд:



Діаніон люмінолу (L^{2-})

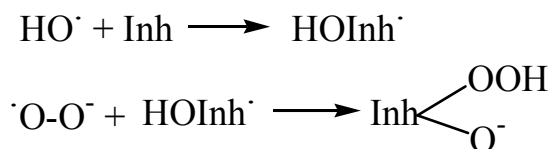


трансанулярний
пероксид

3-амінофталат

При змішуванні лужних розчинів H_2O_2 та H_2L в присутності каталітичної кількості Hb спостерігається хемілюмінесценція (XL), обумовлена виникненням аніону амінофталевої кислоти у електронно-збудженому стані [1]. Ключовою частинкою у послідовності реакцій, які ведуть до виникнення хемілюмінесценції через утворення трансанулярного пероксиду люмінолу (див. схему), при розкладанні якого й утворюється емітер світіння, є аніон-радикал $\cdot O-O^-$ [3, 9]. В літературі наявні вказівки на інгібування хемілюмінесценції під час окиснення H_2L акцепторами $\cdot O-O^-$ радикалу. З іншого боку, під час каталітичного розкладання H_2O_2 , як

правило, утворюються радикали $\text{HO}\cdot$ [3]. Вельми ймовірно, що явище інгібування обумовлене координацією радикалів $\text{HO}\cdot$ з подвійним зв'язком $\text{C}=\text{N}$ імідазольного кільця кофеїну, а відтак рекомбінацією новоутвореного радикалу $\text{HOInh}\cdot$ з супероксид-радикалом $\text{O}-\text{O}^-$ відповідно:



Експериментальна частина

Для досліджень використовували субстанції кофеїну (1,3,7-триметилксантин, моногідрат), бензойної кислоти фармакопейної чистоти, лікарські форми, що містять кофеїн: таблетки кофеїн-бензоату натрію виробництва „Борщагівський ХФЗ”, Київ, Україна, серія 111002; розчин кофеїн-бензоату натрію 10% для ін'єкцій виробництва „Дарниця”, Київ, Україна, серія 10602.

Вихідний 0,001 М розчин люмінолу (5-аміно-2,3-дигідро-1,4-фталазиндіон, H_2L , „Хемапол”, Чехія) готували з очищеного комерційного препарату перекристалізацією з льодової ацетатної кислоти в присутності активованого вугілля, а відтак – з насиченого розчину луку за точною наважкою у 0,01 М розчині гідроксида натрію. В роботі використовували розчини луку без карбонатів.

Для підтримки необхідної кислотності середовища використовували 0,1 М розчин гідроксида натрію, рН розчинів контролювали за допомогою скляного індикаторного електрода ЭСЛ-43-07 в парі з насиченим хлорид срібним електродом та йонміра лабораторного И-130. Усі розчини готували на бідистиляті.

Розчин гідроген 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 мкг/мл

готували розчиненням 7,5 мг гемоглобіну в 75 мл бідистилята при нагріванні та додаванні 0,5 г натрію дигідроген фосфату. Об'єм доводили до позначки бідистилятом при 20°C і перемішували. Робочий розчин гемоглобіну готували розбавленням вихідного бідистилятом точно в 100 разів. Розчин придатний до застосування протягом доби.

Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали на Хемілюмінометрі – 0,1 з фотоелектронним помножувачем ФЭУ-84-А, вимірювачем малих струмів ИМТ-0,5 і швидкодіючим (постійна часу 0,1с) потенціометром-самописцем. Реакцію, що супроводжується хемілюмінесценцією, проводили у кварцовій кюветі циліндричної форми діаметром 30 мм з робочим об'ємом 10 мл. При проведенні дослідів зберігали такий порядок змішування реагентів: до суміші індикатора люмінолу в розчині лугу та гідроген пероксиду (з розчином K або без нього) додавали за допомогою піпеткового дозувача П-1 0,50 мл розчину гемоглобіна і реєстрували кінетичну криву інтенсивності хемілюмінесценції у відносних одиницях (в.од.) ($I_{\text{хл}}$) - час (t). Дозувач влаштований у зйомний тримач, який ізолює фотокатод фотоелектронного помножувача від стороннього світла, а відтак дозволяє працювати при звичайному освітленні. Усі досліди виконували при температурі +18...20°C. Інгібуючий вплив кофеїну оцінювали за величиною депресії (зменшення) максимальної інтенсивності хемілюмінесценції $\Delta I_{\text{хл}} = I_0 - I_{\text{хл}}$, де I_0 – максимальна інтенсивність хемілюмінесценції у відсутності K , $I_{\text{хл}}$ – максимальна інтенсивність хемілюмінесценції в присутності K .

Результати та їх обговорення

Вивчали вплив порядку змішування розчинів H_2L , гідроксида натрію, H_2O_2 , кофеїну й гемоглобіну та їх концентрацій на інтенсивність виникаючої хемілюмінесценції. В результаті проведених досліджень було встановлено, що оптимальним є порядок змішування, коли останнім додається розчин гемоглобіну.

На рис.1 показано типові кінетичні криві хемілюмінесценції в системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ та $H_2L - H_2O_2 - K - Hb$. Наявність K у системі $H_2L - H_2O_2 -$

(*K*) – *Hb* призводить до зменшення максимальної $I_{\text{хл}}$ – інгібування хемілюмінесцентної реакції. Цей ефект зростає при збільшенні концентрації інгібітору процесу. Характер світіння нагадує спалах і відображає нестационарні умови процесу виникнення хемілюмінесценції.

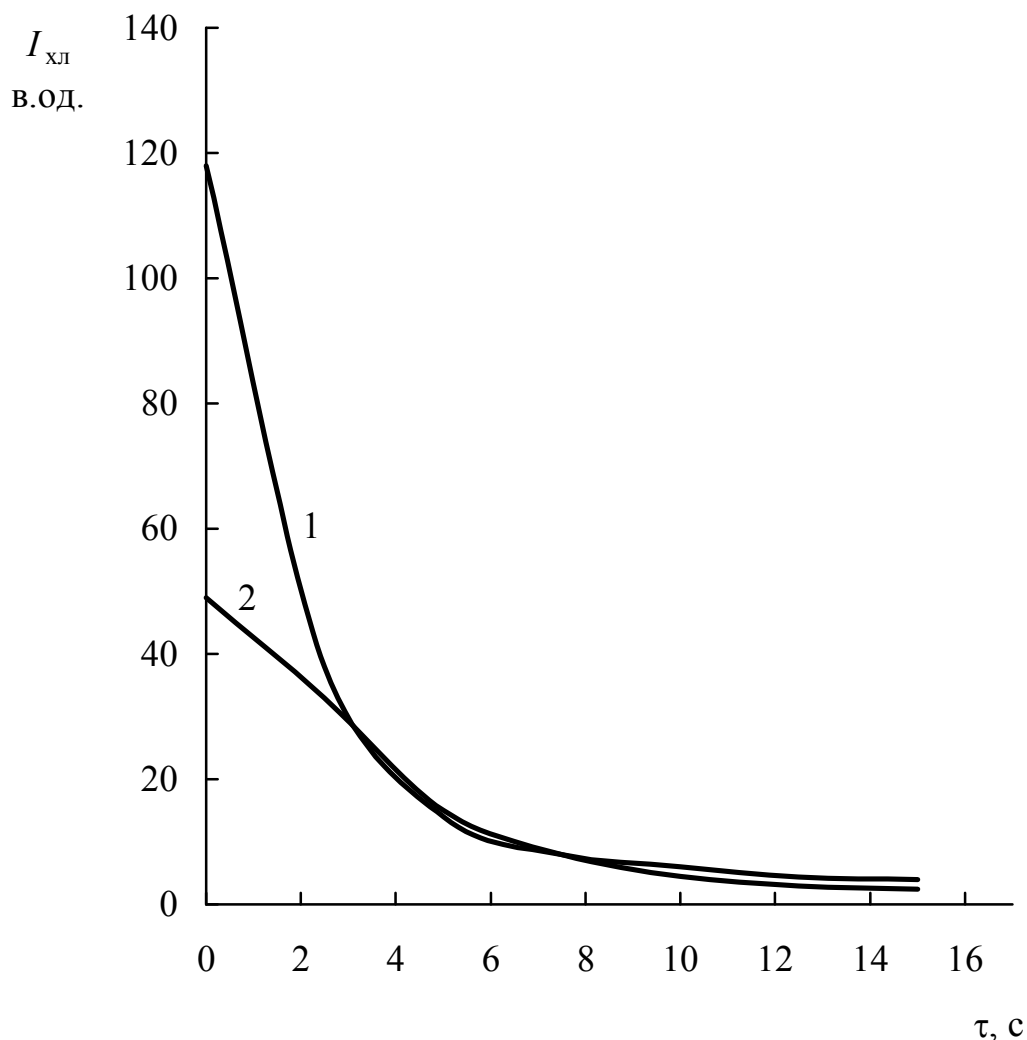


Рис.1 Кінетичні криві хемілюмінесценції в системах: $H_2L - H_2O_2 - Hb$ (1), $H_2L - H_2O_2 - K - Hb$ (2). $c(NaOH) = 0,05$ М, $c(H_2O_2) = 0,075$ М, $c(H_2L) = 10^{-4}$ М, $c(K) = 2 \cdot 10^{-4}$ М, $C(Hb) = 3,75 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл

На рис. 2 наведена залежність депресії (зменшення) максимальної інтенсивності хемілюмінесценції в досліджуваній аналітичній системі від концентрації кофеїну.

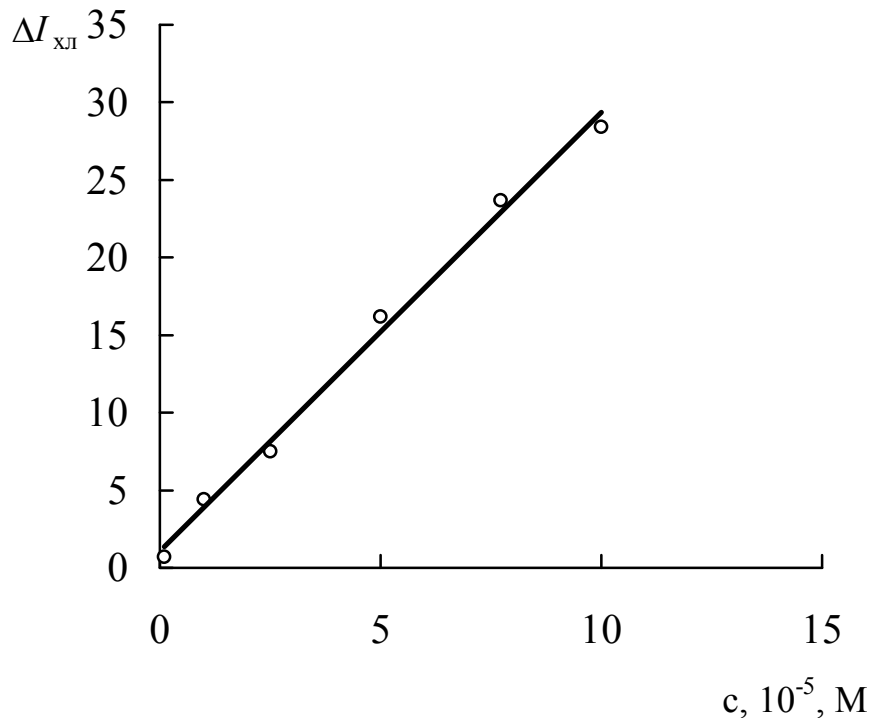


Рис.2 Залежність зміни максимальної інтенсивності хемілюмінесценції в системі $H_2L - H_2O_2 - (K) - Hb$ від концентрації K . $c (NaOH) = 0,05 M$, $c (H_2O_2) = 0,075 M$, $c (H_2L) = 10^{-4} M$, $C (Hb) = 3,75 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл
Лінійна концентраційна залежність ($r = 0,99$; $n = 5$) максимальної $\Delta I_{xл}$ в системі покладена в основу опрацювання методик кількісного визначення K в субстанції та лікарських формах методом хемілюмінесценції.

Кількісне визначення K в препаратах виконували методом порівняння зі стандартом, використовуючи лінійні ділянки згаданої вище концентраційної залежності $\Delta I_{xл}$.

У спеціально проведених досліджах встановлено, що інші компоненти комбінованих лікарських форм (зокрема бензоат натрію) не впливали на ефект інгібіторної дії K у хемілюмінесцентній реакції. Оптимальними концентраціями реактивів у даній хемілюмінесцентній системі є: $c (NaOH) = 0,05 M$, $c (H_2O_2) = 0,075 M$, $c (H_2L) = 10^{-4} M$, $C (Hb) = 3,75 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл.

Приготування стандартного розчину кофеїну

Розчиняють 0,0740 г кофеїну в мірній колбі місткістю 100 мл. Об'єм розчину доводять до позначки бідистилятом при 20 °С. Розчин придатний до застосування протягом доби.

Методика кількісного визначення кофеїну в таблетках кофеїн-бензоату натрію по 0,2 г

Біля 250 мг розтертих таблеток (точна наважка), розчиняють у мірній колбі місткістю 100 мл у бідистиляті і доводять об'єм до позначки при 20°C. Паралельно готують об'ємно-ваговим методом стандартний розчин кофеїну з концентрацією 2 мг/мл на бідистиляті. У кварцову кювету послідовно приливають 1 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М розчину H_2L , 5 мл 0,1 М розчину гідроксида натрію, 2 мл бідистилята, 0,5 мл 5%-ного розчину H_2O_2 , 1 мл розчину таблеток кофеїн-бензоату натрію. Одержану суміш перемішують і встановлюють кювету у світлозахисну камеру. Відкривають шторку і вливають за допомогою піпеткового дозувача 0,5 мл розчину $H\nu$. Аналогічного порядку додавання розчинів дотримуються при виконанні досліду з розчином стандартного зразка. В усіх випадках реєструють максимальне значення інтенсивності світіння у порівнянні до його фонового значення, $\Delta I_{\text{хл}}$. Вміст кофеїну в препараті знаходять методом порівняння $\Delta I_{\text{хл}}$ з розчином стандартного зразка.

Вміст кофеїну в г на таблетку (X) розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot 10 \cdot 100,00 \cdot \bar{m}}{m_n \cdot 1,00},$$

де C – концентрація кофеїну, знайдена методом порівняння з розчином стандартного зразка, г/мл;

10 – об'єм кювети, мл;

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

\bar{m} – середня маса таблетки (n = 20), г;

m_n – маса наважки розтертих таблеток однієї серії, г;

1,00 – аліквотний об'єм розчину таблеток, мл.

Методика кількісного визначення кофеїну в розчині кофеїн-бензоату натрію 10% - 1 мл

1 мл 10% розчину кофеїн-бензоату натрію вносять у мірну колбу місткістю 50,00 мл і доводять об'єм до позначки бідистилятом при 20°C.

Паралельно готують об'ємно-ваговим методом стандартний розчин кофеїну з концентрацією 2 мг/мл на бідистиляті. Далі виконують аналіз, як при визначенні вмісту кофеїну в таблетках кофеїн-бензоату натрію по 0,2 г. Результати виражають кількістю грамів кофеїну в 1 мл препарату.

Таблиця 1

Результати кількісного визначення кофеїну в лікарських формах
($n = 5, P = 0,95$)

Лікарська форма, вміст кофеїну	Знайдено кофеїну, г	Метрологічні характеристики
Таблетки кофеїн-бензоату натрію по 0,2 г „Борщагівський ХФЗ” (Україна) (0,072 – 0,076 г)*	0,0757 0,0748 0,0741 0,0753 0,0739	$\bar{X} = 0,07476$ $S = \pm 0,76 \cdot 10^{-3}$ $S_{\bar{X}} = \pm 0,34 \cdot 10^{-3}$ $\Delta \bar{X} = \pm 0,95 \cdot 10^{-3}$ $S_r = \pm 1,0 \%$ $\delta = -0,6 \%$
Розчин кофеїн-бензоату натрію 10% - 1 мл „Дарниця” (Україна) (0,058 – 0,062 г)**	0,0595 0,0604 0,0613 0,0609 0,0597	$\bar{X} = 0,06036$ $S = \pm 0,76 \cdot 10^{-3}$ $S_{\bar{X}} = \pm 0,34 \cdot 10^{-3}$ $\Delta \bar{X} = \pm 0,95 \cdot 10^{-3}$ $S_r = \pm 1,3 \%$ $\delta = -0,6 \%$

Примітки. вміст K встановлено методом йодометрії [5]:*0,0752 г,** 0,0607 г.

Отже, як видно з наведених даних, одержані результати характеризуються задовільною репродуктивністю – відносне стандартне відхилення не перевищує $\pm 1,3 \%$. Бензоат натрію, який входить до складу лікарських форм препарату не заважає аналізу. Нижня межа визначуваних концентрацій C_n становить $2,12 \cdot 10^{-7}$ г/мл.

ВИСНОВКИ:

1. Вперше вивчено інгібіторний вплив кофеїну на хемілюмінесцентну реакцію окиснення люмінолу гідроген пероксидом у лужному середовищі в присутності гемоглобіну.
2. Опрацьовано методики кількісного визначення кофеїну в субстанції та лікарських формах кофеїн-бензоату натрію методом хемілюмінесценції.

Література:

1. Бабко А. К., Дубовенко Л. И., Луковская Н. М. Хемилюминесцентный анализ. - К: Техніка, 1966. – 250 с.
2. Быков А.М., Маякова Т.И., Малова Т.Н., Дударева Г.Н.//Всерос. конф. «Хим.анал.вещ-в и матер.», Москва, 16-21 апр. 2000 г. - М., 2000. - С. 45 - 46.
3. Ечмаева Т. А., Бердников В. М. // Журнал физической химии. - 1995. - Т. 69, № 6. – С. 1089 - 1091.
4. Компендиум 2000/2001 – Лекарственные препараты /За ред. В.М.Коваленка, О.П.Вікторова. – К.:Моріон, 2000. – 1456 с.
5. Методы анализа лекарств / Максютин Н.П., Каган Ф.Е., Кириченко Л.А., Митченко Ф.А. – К.: Здоров'я, 1984. – 224 с.
6. Пономаренко А. А., Попов Б. И., Амелина Л. М. и др. // Журнал общей химии. – 1964. – Т. 34.- №. 12. – С. 4118 – 4122.
7. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. – 8-е изд. – 2001. – 1503 с.
8. Справочник ВИДАЛЬ. Лекарственные препараты в России: Справочник. – М.:АстраФармСервис, 2003. – 1488 с.
9. Федорова О. С., Бердников В. М. // Теоретическая и экспериментальная химия. – 1983. - № 3. - С. 334 – 339.
- 10.Abu-Qare Agel W., Abou-Donia Mohamed B.I. // Pharm. and Biomed. Anal. - 2001. - V. 26, № 5 - 6. - P. 939 – 942.
- 11.Altun M.L., Seyhan T., Katral M., Atay T., Ozdemir N., Cevheroglu S. // J. Pharm. and Biomed. Anal. - 2001. - V. 25, № 1. - P. 93 - 101.

12. Atwood E.S., Driscoll J.N., Campbell S.J., Morales S. // Pittsburgh conf. [Anal. Chem. find Appl. Spectrosc.] presents PITTCO'95, Neu Orleans, La, March 5-10, 1995: Book Abstr.- [Neu Orleans (La)], 1995. - P. 270.
13. Bispo Marcia S., Veloso Marsia Cristina C., Pinheiro Heloisa Luscia C., De Oliveira Rodolfo F.S., Reis Jose Oscar N., De Andrade Jailson B.J. // Chromatogr. Sci. - 2002. - V. 40, № 1. - P. 45 - 48.
14. Charles Melissa, Martin Nea W., Msimanga Huggins Z. // J. Chem. Educ. - 1997. - V. 74, № 9. - P. 1114 - 1117.
15. Dominguez Vidal A., Carsia Reyes J.F., Ortega Barrales P., Molina Dias A // Anal. Lett. - 2002. - V. 35, № 15. - P. 2433 - 2447.
16. Ferguson Glenda K. // J. Chem. Educ. - 1998. - V 75, № 4. - P. 467 - 469.
17. Ferreyra Carola, Ortiz Cristina // J. Pharm. and Biomed. Anal. - 2001. - V. 25, № 3 - 4. - P. 493 - 499.
18. Frye Reginald F., Stiff Dwight D., Branch Robert A. // J. Liq. Chromatogr. and Relat. Technol. - 1998. - V. 21, № 8. - P. 1161 - 1171.
19. Holland D.T., Godfredsen R.A., Page T., Connor J.D. // J. Chromatogr. B. - 1998. - V. 707, № 1 - 2. - P. 105 - 110.
20. Kartal Murat // J. Pharm. and Biomed. Anal. - 2001. - V. 26, № 5 - 6. - P. 857 - 864.
21. Kumazawa Takeshi, Seno Hiroshi, Lee Xiao-pen, Ishii Akira, Watanabe-Sujuki Kanako, Sato Keizo, Sujuki Osamu // Anal. chim. acta. - 1999. - V. 387, № 1. - P. 53 - 60.
22. Martin M.I., Pablos F., Gonzalez A.G. // Talanta. - 1999. - V. 49, № 2. - P. 453 - 459.
23. Ortega-Barrales P., Padilla-Weigand R., Molina-Diaz A. // Anal. Sci. - 2002. - V. 18, № 11. - P. 1241 - 1246.
24. Roswell D. F., White E. H. // Methods Enzymol. - 1978. - V. 57. - P. 409 - 423.
25. Sun P., Mariano G.J., Barker G., Harfwick R.A. // Anal. Lett. - 1994. - V. 27, № 5. - P. 927 - 937.

26. Vogt C., Conradi S., Rohde E. // J. Chem. Educ. - 1997. - V. 74, № 9. - P. 1126 - 1130.
27. Watanabe Toshiro, Nishiya ma Rika, Yamamoto Akira, Nagai Shiro, Terabe Shigeru // Anal. Sci. - 1998. - V. 14, № 2. - P. 435 - 438.
28. Wu Gen, Gao Zhi-feng, Rong Yan-Hua // J. Hebei Univ. Sci. and Techn. - 2002. - V. 23, № 3. - P. 13 - 16.
29. Yang Min J., Orton Maureen L., Pawliszyn Janusz // J. Chem. Educ. - 1997. - V. 74, № 9. - P. 1130 - 1132.
30. Zen Jyn-Myng, Ting-Yuan-Shih, Shih Ying // Analyst. - 1998. - V. 123, № 5. - P. 1145 - 1147.

Н.Ю. Бондаренко, Н.Е. Блажеевский

Количественное определение кофеина хемилюминесцентным методом в лекарственных формах

Разработаны методики хемилюминесцентного определения кофеина в субстанции, инъекционных растворах и таблетках кофеин-бензоата натрия, основанные на ингибировании реакции хемилюминесцентного окисления люминола пероксидом водорода, катализируемой гемоглобином крови. Относительное стандартное отклонение не превышает $\pm 1,3$ %. Нижняя граница определяемых концентраций составляет $2,12 \cdot 10^{-7}$ г/мл. Бензоат натрия, который входит в состав комбинированных лекарственных форм, не мешает проведению анализа.

Bondarenko N. U., Blazheevskiy M. Y.

Summary

Quantitative determination of caffeine in drugs by chemoluminescent method

The method of caffeine chemiluminescent determination in substance and different forms based on reaction of inhibition of chemiluminescent oxidation of

luminol by hydrogen peroxide, catalyzed by blood hemoglobin have been elaborated. The typical relative standard deviation is $\pm 1,3$ %. A lower limit of determining concentration is $2,12 \cdot 10^{-7}$ g/ml. It was determined, that natrii benzoic, included in composition of combined forms contained caffeine doesn't impede of its determination.