

## Определение ондансетрона на угольно-пастовом электроде с использованием производной вольтамперометрии

В. В. Варченко<sup>1</sup>, Д. В. Стрилец<sup>2</sup>, К. Н. Беликов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-технологический комплекс «Институт монокристаллов»  
Национальной академии наук Украины, пр. Ленина, 60, Харьков, Украина, 61178

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина  
пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022; e-mail: varchenko@isc.kharkov.com

Поступила: 08 ноября 2014 г / Принята к публикации: 21 января 2015 г.

*Изучено электрохимическое поведение ондансетрона на угольно-пастовом электроде на основе тритоллил фосфата. Установлено, что ондансетрон необратимо окисляется с переносом одного электрона. В интервале pH 2-4 потенциал пика и его высота не зависят от pH среды. Установлено, что при определении ондансетрона 0.1 М раствор сульфата натрия является наилучшим фоновым электролитом, обеспечивающим наиболее низкое значение предела обнаружения. На основании проведенного исследования была разработана простая и быстрая вольтамперометрическая методика определения ондансетрона в моче человека. Для улучшения разрешения и повышения чувствительности был применен метод производной вольтамперометрии. При определении содержания ондансетрона в моче использовали нелинейный метод стандартных добавок; предел обнаружения составил  $7 \cdot 10^{-7}$  М.*

**V.V. VARCHENKO, D.V. STRILETS, K.N. BELIKOV. DETERMINATION OF ONDANSETRON AT A CARBONE PASTE ELECTRODE BY DERIVATIVE VOLTAMMETRY.** *The electrochemical behavior of ondansetron was studied at a tritolyl phosphate – based carbon paste electrode. It was found that ondansetron is irreversibly oxidized with a one electron transfer. In the pH range of 2-4 peak potential and peak height do not depend on pH. When determining ondansetron, 0.1 M sodium sulfate solution was found to be the best supporting electrolyte, providing the lowest detection limit. Based on this study a simple and rapid voltammetric method was developed for ondansetron determination in human urine. Derivative voltammetry was used to improve the resolution and increase the sensitivity. For ondansetron quantification in human urine, nonlinear standard addition method was used; a detection limit was  $7 \cdot 10^{-7}$  M.*

**Ключевые слова:** ондансетрон, угольно-пастовый электрод, дифференциальная импульсная вольтамперометрия, производная вольтамперометрия

**Keywords:** ondansetron, carbon paste electrode, differential pulse voltammetry, derivative voltammetry

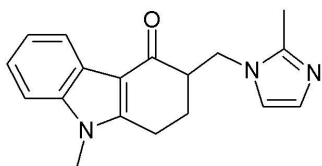
Ондансетрон (рис. 1) – избирательный антагонист серотониновых рецепторов, который применяется для устранения тошноты и рвоты, возникающих вследствие химио- или радиотерапии. Метаболизм ондансетрона в организме человека протекает путем гидроксирования индольного кольца, за которым следует образование конъюгатов. Около 5% введенной дозы выводится с мочой в неизменном виде [1].

Для определения ондансетрона используют жидкостную хроматографию [2-4], спектрофотометрию [5], электрофорез [6]. Также для этих целей применяют вольтамперометрию – один из самых популярных методов определения содержания биологически активных соединений

в различных объектах. Авторами [7] была разработана методика определения ондансетрона в лекарственных препаратах на стационарном ртутном электроде, предел обнаружения составил  $1.7 \cdot 10^{-8}$  М. Однако, из-за токсичности ртутного электрода существует тенденция к уменьшению его использования в анализе и созданию новых безопасных электродов. Отмечена электрохимическая активность ондансетрона на стеклоуглеродном электроде [8], но процесс окисления характеризуется медленным переносом электронов, что делает его непригодным для количественных измерений. Модифицирование поверхности стеклоуглеродного электрода многостенными углеродными нанотрубками

позволило успешно использовать метод для определения ондансетрона в модельных растворах и плазме крови человека (предел обнаружения для модельных растворов составил  $3.1 \cdot 10^{-8}$  М).

В настоящей работе предложен новый способ вольтамперометрического определения ондансетрона с использованием угольно-пастового электрода с тритолил фосфатом в качестве связующей жидкости. Предварительные исследования показали, что на таком электроде окисление ондансетрона проходит при высоких анодных потенциалах, поэтому мешающее влияние оказывают процессы окисления компонентов фонового электролита. Для улучшения разрешения сигналов и повышения чувствительности определения воспользовались преимуществами производной вольтамперометрии [9]. Разработанная методика была применена для определения содержания ондансетрона в моче человека.



**Рис. 1.** Структурная формула ондансетрона ((RS)-9-метил-3-[(2-метил-1H-имидазол-1-ил)метил]-2,3-дигидро-1H-карбазол-4(9H)-он).

### Материалы и методика исследований

**Реагенты и растворы.** Для приготовления всех растворов использовали ультрачистую деионизированную воду (сопротивление  $18.2 \text{ МОм см}^{-1}$ ). Ондансетрон гидрохлорид был предоставлен фармацевтической компанией «Здоровье» (Харьков, Украина). Исходный раствор ондансетрона с концентрацией 2 г/л готовили, растворяя точную навеску ондансетрона в воде. Раствор хранили при температуре около  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Рабочие растворы ондансетрона готовили путем разбавления исходного раствора ондансетрона непосредственно перед измерениями. Измерения проводили в среде универсального буферного раствора (смесь борной, уксусной и ортофосфорной кислот), в котором концентрация каждой из кислот составляла 0.04 М. Необходимое значение pH в рабочих буферных растворах создавали путем добавления раствора гидроксида натрия с концентрацией 1 М. Растворы хлорида натрия, перхлората натрия, нитрата натрия, сульфата натрия с концентрациями 0.1 М готовили растворением соответствующих солей в воде. Тритолил фосфат (99%, смесь изомеров, ABCR) и угольный порошок для спектрального анализа (Мега Сиб Групп, Киев, Украина) использовались для приготовления пасты электродов. 30% перекись водорода (Fluka) использовалась для обработки угольного порошка.

**Приготовление угольно-пастовых электродов.** Угольный порошок предварительно обрабатывали раствором перекиси водорода. Для этого к навеске угольного порошка массой около 1 г добавляли 10 мл 30% перекиси водорода, тщательно перемешивали и оставляли на 12 часов. Затем угольный порошок отфильтровывали, несколько раз промывали водой и высушивали. Такая обработка приводит к увеличению количества кислородсодержащих групп на поверхности порошка и ускорению переноса электронов при электрохимических реакциях [10].

Пасту для электродов готовили путем смешивания определенного количества угольного порошка с тритолил фосфатом с последующим растиранием в ступке. Соотношение угольный порошок:связующее вещество составляло 70:30 по массе. При увеличении содержания углерода ухудшаются механические свойства пасты, а при уменьшении – падает проводимость.

Полученной пастой заполняли полиэтиленовую трубку диаметром 3 мм, а в качестве токосъемника использовали серебряную проволоку, которую вставляли в пасту. Очистку поверхности электрода проводили перед каждой серией измерений (одного электрода хватало на 20-25 таких серий). Для этого небольшой слой пасты выдавливали из трубки и срезали, а поверхность шлифовали фильтровальной бумагой.

**Проведение вольтамперометрических измерений.** Все вольтамперометрические измерения были выполнены на вольтамперометрическом анализаторе «797VA-Computrace» (Metrohm, Швейцария) с программным обеспечением версии 1.3. Использовалась трехэлектродная ячейка, состоящая из угольно-пастового рабочего электрода, хлорсеребряного электрода сравнения и платинового вспомогательного электрода. Перед выполнением измерений растворы продували в течение 120 с азотом, чтобы обеспечить отсутствие взаимодействия исходной электроактивной молекулы или промежуточных продуктов ее окисления с кислородом.

Для записи вольтамперограмм использовали два различных режима – циклический и дифференциальный импульсный. Для дифференциального импульсного режима оптимальные аппаратные параметры подбирали экспериментально. Для этого амплитуду импульса варьировали в интервале 0.01...0.1 В, длительность импульса – 0.01...0.1 с, скорость развертки – 0.01...0.05 В/с, потенциал накопления – 0.4...(-0.6) В, а время накопления – 10...120 с.

Дифференцирование и сглаживание данных (использовался 10-точечный фильтр Савицкого-Голея) осуществляли с помощью программы Origin.

**Анализ мочи.** Образцы мочи были получены от здоровых людей в возрасте 20-50 лет.

К образцам добавляли исходный раствор ондансетрона так, чтобы получить концентрации ондансетрона  $3 \cdot 10^{-6}$ ,  $6 \cdot 10^{-6}$  и  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л, а затем разбавляли в 10 раз 0.1 М раствором  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и переносили в ячейку для вольтамперметрических измерений. Вольтамперграммы регистрировали в дифференциальном импульсном режиме.

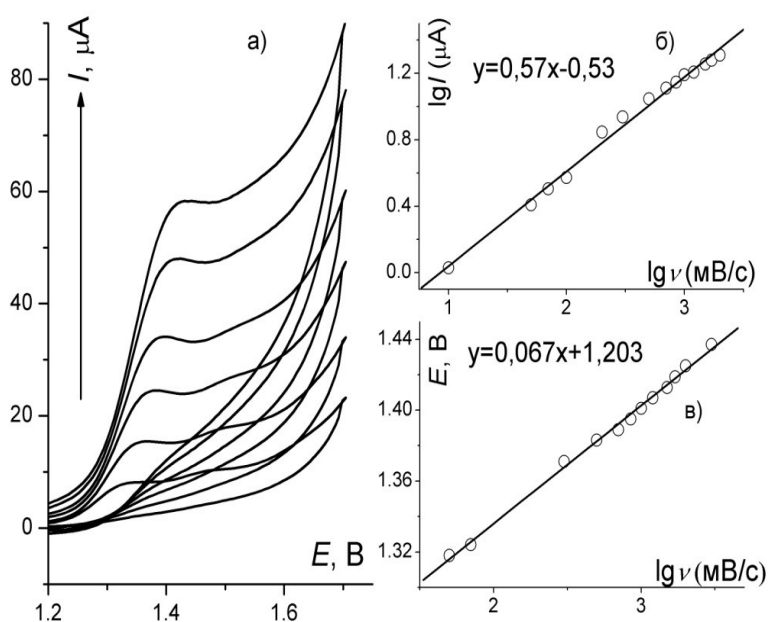
## Результаты исследований и их обсуждение

**Циклическая вольтамперметрия ондансетрона.** На угольно-пастовом электроде ондансетрон необратимо окисляется при потенциалах около 1.35 В (рис. 2). С увеличением скорости развертки высота сигнала увеличивается, а его потенциал смещается к

более высоким значениям. Угловым коэффициентом зависимости  $\lg I$  от  $\lg v$  близок к 0.5, следовательно, скорость окисления ондансетрона лимитируется диффузией. Для необратимого процесса окисления выполняется соотношение [11]:

$$\left(\frac{\partial E}{\partial \lg v}\right)_{25^\circ\text{C}} = \frac{29,6}{\alpha n} \text{ мВ.}$$

Принимая, что  $\alpha$  близко к 0.5, по угловому коэффициенту зависимости  $E$  от  $\lg v$  можно оценить количество электронов, принимающих участие в окислении. В нашем случае угловым коэффициентом составляет 0.067 В и, следовательно, окисление сопровождается переносом одного электрона.



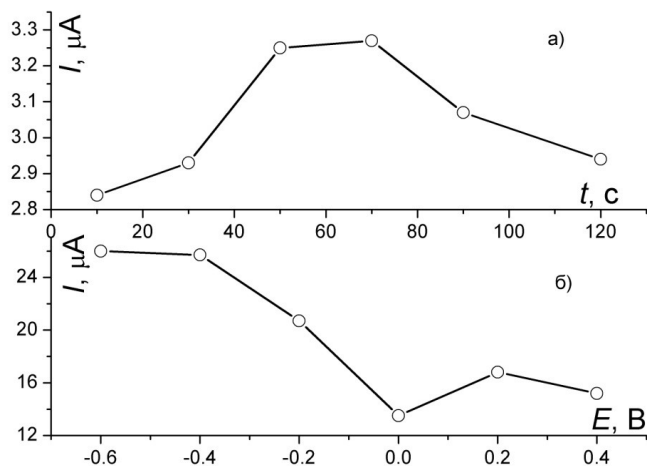
**Рис. 2.** а) Циклические вольтамперограммы ондансетрона ( $c = 3 \cdot 10^{-4}$  М) при различных скоростях развертки – 0.05, 0.2, 0.5, 1, 2, 3 В/с; фоновый электролит – универсальный буферный раствор с рН 2; б) зависимость  $\lg I$  от  $\lg v$ ; в) зависимость  $E$  от  $\lg v$ .

рН фонового электролита в интервале от 2 до 4 не оказывает существенного влияния на положение и высоту сигнала ондансетрона. При  $\text{pH} > 4$  пик значительно уширяется. Подобные закономерности наблюдались и при изучении окисления ондансетрона на стеклоуглеродном электроде [8].

Окисление ондансетрона происходит, вероятнее всего, по имидазольному кольцу. На первой стадии образуется катион-радикал [12], который затем может вступать в различные превращения, например в реакцию димеризации [13].

**Дифференциальная импульсная вольтамперметрия ондансетрона.** Выбор оптимальных аппаратных параметров. Экспериментально были установлены зависимости величины сигнала от амплитуды импульса, длительности импульса и скорости развертки

потенциала. Значения параметров подбирались таким образом, чтобы достичь максимального значения сигнала при минимальном значении фонового тока. Для амплитуды импульса было выбрано значение 0.08 В, длительности импульса – 0.05 с, скорости развертки – 0.01 В/с. При изучении зависимости сигнала от потенциала и времени накопления (рис. 3) установлено, что ондансетрон накапливается на угольно-пастовом электроде при отрицательных потенциалах. Увеличение потенциала накопления приводит к возрастанию тока окисления, однако возрастает и фоновый ток. Поэтому для количественного определения ондансетрона было выбрано значение потенциала накопления -0.4 В. С увеличением времени накопления высота сигнала проходит через максимум при значении 70 с.

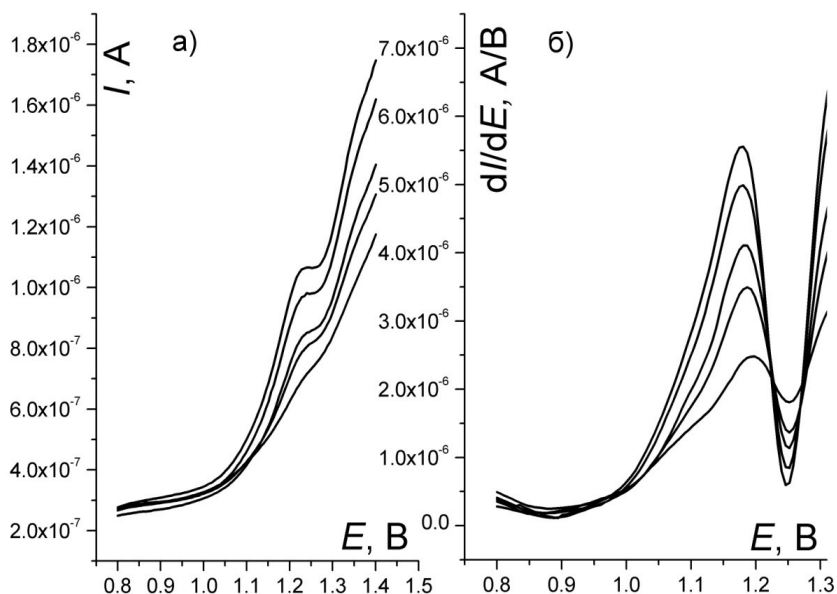


**Рис. 3.** Зависимость высоты сигнала от времени (а) и потенциала накопления (б), фоновый электролит – универсальный буферный раствор с рН 2.

**Влияние фонового электролита.** Кроме универсальной буферной смеси, были исследованы следующие фоновые электролиты: хлорид натрия, перхлорат натрия, нитрат натрия, сульфат натрия с концентрациями 0.1 М. Максимальная чувствительность определения ондансетрона наблюдалась при использовании универсальной буферной смеси (рН 2-4) и раствора сульфата натрия. Для количественного определения содержания ондансетрона в качестве фонового электролита использовали более простую систему – раствор сульфата натрия.

**Численное дифференцирование сигнала.** Окисление ондансетрона происходит в области, близкой к области окисления фонового электролита.

При малых концентрациях ондансетрона правая ветвь пика искажается, вследствие наложения процессов окисления ондансетрона и компонентов фонового электролита. Сигнал приобретает форму псевдоволны, в некоторых случаях достаточно плохо выраженной. Нами показано, что используя производную вольтамперометрию, эти два процесса можно разделить. При этом производная вольтамперограмма окисления ондансетрона имеет форму пика, высоту которого легко измерить. На рис. 4 представлены дифференциальные импульсные вольтамерограммы ондансетрона при различных концентрациях и их первые производные.



**Рис. 4.** а) – Дифференциальные импульсные вольтамперограммы ондансетрона,  $c = 2.4 \cdot 10^{-7}$ ,  $7.2 \cdot 10^{-7}$ ,  $9.5 \cdot 10^{-7}$ ,  $1.4 \cdot 10^{-6}$ ,  $1.7 \cdot 10^{-6}$  М, фоновый электролит – сульфат натрия; б) – соответствующие первые производные

**Метрологические характеристики вольтамперометрического определения ондансетрона в модельных растворах.** Диапазон линейности и предел обнаружения, оцененные для модельных водных растворов, приведены в таблице 1. Для построения градуировочного графика использовали значение первой производной при потенциалах около 1.18 В. Предел обнаружения оценивали из градуировочного графика (критерий  $3\sigma$ ) [14].

**Таблица 1.** Аналитические характеристики определения ондансетрона в модельных растворах с помощью производной дифференциальной импульсной вольтамперометрии.

Диапазон линейности, М	$1.2 \cdot 10^{-6}$ – $1.5 \cdot 10^{-5}$
Угловой коэффициент	2.6
Свободный член	$4.6 \cdot 10^{-6}$
Коэффициент корреляции	0.995
Предел обнаружения, М	$5 \cdot 10^{-8}$

#### Определение ондансетрона в моче человека.

В области потенциалов окисления ондансетрона в разбавленной в 10 раз моче не наблюдалось посторонних сигналов. Однако, химические соединения, присутствующие в моче (например, карбамид, содержащийся в больших количествах), адсорбируются на поверхности электрода, в результате чего градуировочная функция электрода в области концентраций, исследованной на модельных растворах, становится нелинейной. В связи с этим содержание ондансетрона в моче определяли с помощью нелинейного метода стандартных добавок [15]. В качестве аналитического сигнала использовали значение первой производной вольтамперометрического сигнала при потенциале 1.18 В. Результаты проверки правильности разработанной методики приведены в таблице 2.

#### Литература

1. Salem I.I., López J.M.R., Galán A.C. Ondansetron Hydrochloride. *Anal. Profiles Drug Subs. Excip.* 2001, 27, 301–338.
2. Dépôt M., Leroux S., Caillé G. High-resolution liquid chromatographic method using ultraviolet detection for determination of ondansetron in human plasma. *J. Chromatogr. B.* 1997, 693 (2), 399–406.
3. Liu K., Dai X., Zhong D., Chen X. Quantitative determination of ondansetron in human plasma by enantioselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2008, 864 (1–2), 129–136.
4. Ninama G., Patel R., Patel M., Shah G. Solid phase extraction liquid chromatography mass spectrometry method with electrospray ionization for

**Таблица 2.** Результаты анализа мочи человека с добавками ондансетрона ( $n=3$ ;  $P=0.95$ )

Введено, М	Найдено, М	$s_r$
$3.1 \cdot 10^{-6}$	$(3.0 \pm 0.4) \cdot 10^{-6}$	0.054
$6.0 \cdot 10^{-6}$	$(6.3 \pm 0.5) \cdot 10^{-6}$	0.032
$1.0 \cdot 10^{-5}$	$(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$	0.073

Предел обнаружения ондансетрона в моче человека, оцененный по  $3\sigma$ -критерию, составил  $7 \cdot 10^{-7}$  М. В литературе известна методика определения ондансетрона в моче крыс с использованием ВЭЖХ [16]. Предел обнаружения составляет  $7 \cdot 10^{-8}$  моль/л, однако требуется длительная и трудоемкая пробоподготовка, включающая экстракцию. Кроме того, существует методика экстракционно-спектрофотометрического определения ондансетрона в моче человека [5]. Однако в этом случае чувствительность слишком низкая для определения реальных концентраций ондансетрона.

#### Заключение

Электрохимическое окисление ондансетрона на угольно-пастовом электроде является необратимым процессом, контролируемым диффузией, и сопровождается переносом одного электрона. Наилучшим фоновым электролитом при определении содержания ондансетрона в моче человека является 0.1 М раствор сульфата натрия. Показано, что численное дифференцирование вольтамперограмм позволяет разделить сигналы, соответствующие процессам окисления ондансетрона и фонового электролита. Разработана простая и экспрессная методика определения ондансетрона в моче человека с использованием нелинейного метода стандартных добавок. Предел обнаружения ондансетрона в моче человека составил  $7 \cdot 10^{-7}$  М.

the determination of Ondansetron in human plasma: Development and validation consideration. *Arab. J. Chem.* 2013.

5. Zamora L.L., Calatayud J.M. Extractive Spectrophotometric Determination of Ondansetron by Ion-Pair Formation with Bromocresol Green. *Anal. Lett.* 1996, 29 (5), 785–792.

6. Siluveru M., Stewart J.T. Enantioselective determination of S-(+)- and R-(–)-ondansetron in human serum using derivatized cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B.* 1997, 691 (1), 217–222.

7. Svancara I., Vytrās K., Kalcher K., Walcarious A., Wang J. Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and

Electroanalysis. *Electroanalysis*. 2009, 21 (1), 7–28.

8. Nigović B., Sadiković M., Sertić M. Multi-walled carbon nanotubes/Nafion composite film modified electrode as a sensor for simultaneous determination of ondansetron and morphine. *Talanta*. 2014, 122, 187–194.

9. Murthy A., Manthiram A. Application of Derivative Voltammetry in the Analysis of Methanol Oxidation Reaction. *J. of Phys. Chem. C*. 2012, 116 (5), 3827–3832.

10. Rice M.E., Galus Z., Adams R.N. Graphite paste electrodes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem*. 1983, 143 (1-2), 89–102.

11. Nadjo L., Savéant J.M. Linear sweep voltammetry: Kinetic control by charge transfer and/or secondary chemical reactions. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem*. 1973, 48 (1), 113–145.

12. Raczyńska E.D. Quantum-chemical studies

of the consequences of one-electron oxidation and one-electron reduction for imidazole in the gas phase and water. *Comp. Theor. Chem*. 2012, 993, 73–79.

13. Wang H.L., O'Malley R.M., Fernandez J.E. Electrochemical and Chemical Polymerization of Imidazole and Some of Its Derivatives. *Macromolecules*. 1994, 27 (4), 893–901.

14. Vogelgesang J., Hädrich J. Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. *Accredit. Qual. Assur*. 1998, 3 (6), 242–255.

15. Kościelniak P. Nonlinear calibration by the standard addition method. *Chemom. Intell. Lab. Syst*. 1999, 47 (2), 275–287.

16. Yang S.H., Yang K.H., Lee M.G. Gender differences in ondansetron pharmacokinetics in rats. *Biopharm. Drug Dispos*. 2008, 29 (7), 406–413.