

УДК 543.42:546–328:615.074:577.175.5

Ю. П. Бас, О. А. Запорожець

**ЗМІШАНА МОЛБДОФОСФОРНОСТИБІЄВА ГПК ЯК ТВЕРДОФАЗНИЙ
АНАЛІТИЧНИЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КАТЕХОЛАМІНІВ**

Визначення катехоламінів має важливе значення у клінічній діагностиці хвороб, оскільки зміна їх концентрації у біологічних рідинах є індикатором багатьох патологічних станів організму. Досить чутливими реагентами для визначення катехоламінів є гетерополікислоти. Однак, наявні спектрофотометричні методики з їх використанням характеризуються рядом недоліків, що пов'язані з псевдоколоїдним станом реагенту у розчині та низькою його стійкістю у часі. Більшості з них можна уникнути шляхом перенесення аналітичної реакції на межу розділу фаз «сорбент – розчин».

Розроблено новий окисно-відновний реагент на основі іонного асоціату «четвертинна амонієва сіль аліфатичної природи (ЧАС) – змішана молібдофосфорностибієва гетерополікислота» для твердофазно-спектрофотометричного визначення катехоламінів. Як матрицю обрано мезопористий силікагель SG-60 фірми Merck. Твердофазний реагент отримано шляхом вилучення гетерополіаніону з водного розчину силікагелем, модифікованим ЧАС, впродовж 5 хв. Окисно-відновні властивості розробленого твердофазного реагенту було перевірено при взаємодії з розчином модельної сполуки – адреналіну. Лінійність градувального графіку зберігається у межах 4.6–92.0 мг/л. Межа виявлення адреналіну, розрахована за 3s-критерієм, становить 1.7 мг/л. Розроблений твердофазний реагент було апробовано при аналізі фармацевтичних препаратів місцевих анестезій.

Ключові слова: *твердофазний реагент, гетерополікислоти, катехоламіни, адреналін, місцева анестезія.*

Вступ

Катехоламіни – фізіологічно-активні речовини, які виконують роль хімічних посередників, медіаторів і нейрогормонів у міжклітинних взаємодіях у тварин і людини. Катехоламіни є похідними пірокатехіну, що містять такі нейромедіатори, як адреналін (епінефрин), норадреналін (норепінефрин), дофамін (допамін) та L-допа. Вони відіграють важливу біологічну роль в організмі людини, а саме: приймають участь у регулюванні серцево-судинної системи, вуглеводного та жирового обміну, функцій гладкої мускулатури, функцій згортання крові та мають судинозвужуючу дію [1]. Тому визначення катехоламінів у біологічних рідинах має важливе значення у клінічній діагностиці хвороб, оскільки зміна їхньої концентрації у сечі чи у крові є індикатором багатьох патологічних станів організму, зокрема інфаркту міокарду, атеросклерозу на різних стадіях, ферохромоцитомі [2].

Більшість методів визначення катехоламінів ґрунтуються на їхніх окисно-відновних властивостях. Найбільш широко для визначення катехоламінів застосовуються хемілюмінесцентні [3], хроматографічні [4], електрохімічні [5] методи. Межа виявлення аналітів такими методами досить низька і коливається у межах 0.01 мкг/л – 1.4 мг/л. Втім вони є досить складними у виконанні, довготривалими, а інколи потребують застосування токсичних органічних розчинників. Не поступаються за чутливістю спектрофотометричні (СФ) методи визначення катехоламінів, що ґрунтуються на їх здатності за певних умов відновлювати молібдоарсенову гетерополікислоту (ГПК) [6]. ГПК структури Кеггіна мають унікальну здатність до зворотного відновлення, внаслідок чого утворюються інтенсивно забарвлені змішановалентні сполуки [7]. Завдяки цьому відновлені форми ГПК використовують як реагенти для визначення окисників, а реакції окиснених жовтих форм ГПК покладено в основу СФ методик визначення неорганічних та органічних відновників, зокрема сірководню, стануму (II), нітриту, аскорбінової кислоти [8], тощо. Однак наявні на сьогодні методики визначення відновників з використанням ГПК у розчині, як правило, характеризуються незадовільною відтворюваністю із-за псевдоколоїдного стану ГПК у розчині, вузького робочого діапазону рН та низької стабільності реагенту у часі. Одним із шляхів вирішення вказаних проблем є перенесення аналітичної реакції на межу розділу фаз «сорбент–розчин», що реалізується при застосуванні твердофазних окисно-відновних реагентів (ТР). Для визначення катехоламінів раніше було запропоновано ТР на основі іонного асоціату четвертинної амонієвої солі та реактиву Фоліна, який є сумішшю фосфорних ГПК молібдену та вольфраму [9]. Основним його недоліком є невідомий склад реагенту, який може змінюватися від партії до партії, що

буде впливати на хіміко-аналітичні властивості розробленого ТР. Тому **метою даної роботи** була розробка ТР на основі іммобілізованого на кремнеземі (КЗ) іонного асоціату “четвертинна амонієва сіль – окиснена фосфорна ГПК” точно відомого складу для твердофазно-спектрофотометричного визначення катехоламінів у фармацевтичних препаратах та біологічних рідинах.

Метод дослідження

У роботі дослідження проводились методом твердофазної спектрофотометрії (ТСФ) шляхом реєстрації світлопоглинання сорбенту, обробленого розчином аналіту [10]. Суттєвим обмеженням методу є власне (“фонове”) поглинання матриці та розсіювання світла високодисперсними сорбентами. На значення і відтворюваність аналітичного відгуку істотно впливає спосіб реєстрації світлопоглинання. Найбільш раціональним способом реєстрації поглинання сорбентів є гетерохроматична екстраполяція при двох довжинах хвиль та при максимальному наближенні кювети до віконця детектора приладу. Аналітичним сигналом у такому разі є ΔA , що розраховується за рівнянням:

$$\Delta A = (A'_{\max} - A'_{\min}) - (A''_{\max} - A''_{\min}),$$

де A'_{\max} і A''_{\max} – поглинання модифікованого сорбенту при λ_{\max} у присутності та за відсутності аналіту, A'_{\min} і A''_{\min} – поглинання при 995 нм у присутності та за відсутності аналіту відповідно. Метод гетерохроматичної екстраполяції дає змогу врахувати власне поглинання матриці та нівелювати похибки, пов'язані з вимірюванням поглинання у твердій фазі.

Реагенти

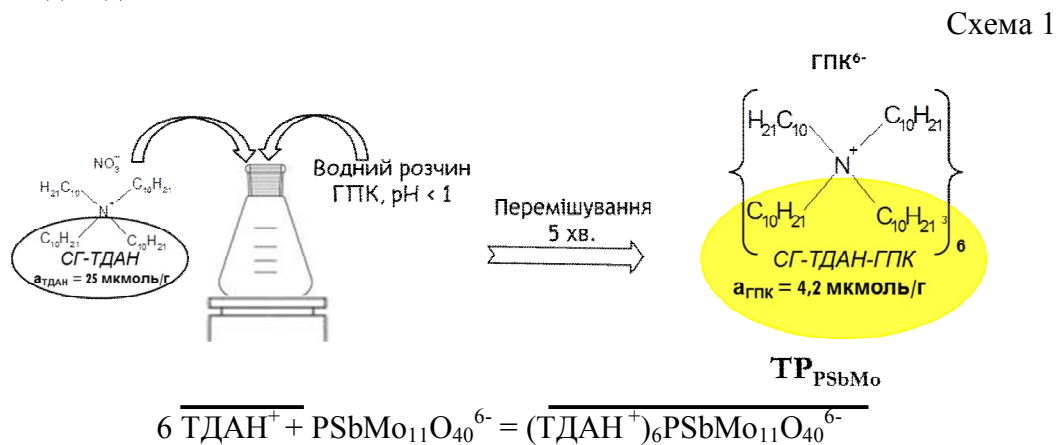
Використовували хлороформ, гексан, тетрадециламоній нітрат, кваліфікації ч.д.а; адреналін гідротартрат, кваліфікації фарм., боратний буферний розчин (рН 10.6), приготовлений відповідно [11], Як матрицю для іммобілізації аналітичних реагентів було використано мезопористий силікагель SG-60 (Merck, Німеччина) $S_{\text{пит}} = 490 \text{ м}^2/\text{г}$; $d_{\text{пор}} = 6.0 \text{ нм}$; рН суспензії = 6.5–7.5) з огляду на такі його специфічні властивості, як висока швидкість встановлення гетерогенної рівноваги, відсутність набухання, термічна та хімічна стійкість [12]. Для модифікації силікагелю обрано аліфатичну четвертинну амонієву сіль – тетрадециламонію нітрат (ТДАН). Вибір модифікатора обумовлений особливостями хімічної будови, відсутністю власного поглинання у видимому діапазоні спектру та здатністю міцно утримувати на поверхні гетерополіаніон за рахунок взаємодії за іон-асоціативним механізмом та за участю активних груп матриці [13] Як окисно-відновний реагент обрали молібдофосфорностибієву гетерополікислоту (PSbMo). Модифікацію сорбенту ТДАН здійснювали з хлороформно-гексанової суміші відповідно до [14]. Ємність сорбенту (ТДАН-СГ) за модифікатором становила 25 мкмоль/г.

Результати та обговорення

Відомо, що молібденові ГПК фосфору є найбільш розповсюдженими аналітичними формами для визначення ряду відновників [8]. При заміщенні одного із атомів молібдену у молібдофосфорній ГПК структури Кеггіна на атом багатозарядного металу стійкість комплексу різко підвищується та збільшується інтервал кислотності утворення ГПК [15–17]. З огляду на це, при розробці твердофазного окисно-відновного реагенту аналітичною формою було обрано змішану PSbMo ГПК складу $\text{H}_6\text{PSbMo}_{11}\text{O}_{40}$. PSbMo швидко утворюється та відновлюється (5 хв.) при кімнатній температурі та є менш розчинною, порівняно із $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$, що особливо важливо у випадку вилучення

ГПА у фазу сорбенту. Крім того, доступність реагентів та простота процедури отримання та відновлення PSbMo обумовили вибір даної аналітичної форми для розробки готової аналітичної форми на її основі для подальшої розробки методик ТСФ й тест-визначення катехоламінів.

ТР на основі PSbMo ГПК отримували шляхом вилучення гетерополіаніону з водного розчину за оптимальних умов його існування, силікагелем, модифікованим ТДАН, відповідно до схеми 1.



Окисно-відновні властивості розробленого ТР було перевірено при взаємодії з органічними відновниками – катехоламінами. Як модельну сполуку для дослідження було обрано адреналін. З рис. 1 видно, що світлопоглинання сорбенту у тонкому шарі зростає пропорційно збільшенню концентрації адреналіну у розчині, що було використано для розробки методики твердофазно-спектрофотометричного визначення катехоламінів.

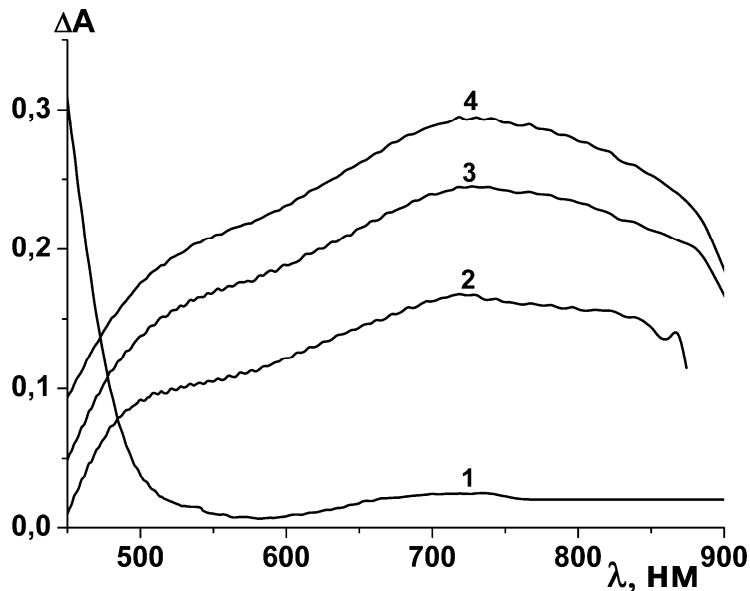
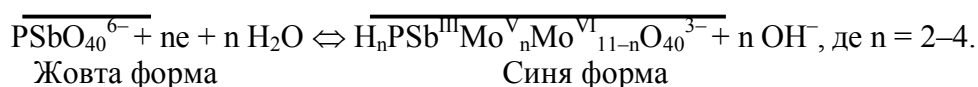


Рис. 1. Спектр поглинання ТР, оброблених розчином адреналіну з концентрацією, мг/л: 0 (1); 8 (2); 33 (3), 82 (4); $V/m = 67$ мл/г, $pH=10.6$, $l=0.1$ см; $\Delta A = A - A_{хол.}$

Враховуючи, що в розчині відновлені гетерополікислоти існують у формі тризарядного аніону, взаємодію іммобілізованої PSbMo ГПК з адреналіном на межі розділу фаз можна представити схемою:



За оптимальних умов взаємодії ТР з адреналіном було побудовано градувальний графік (ГГ) для визначення катехоламінів. Для побудови ГГ у стакан, ємністю 50.0 мл, вносили 0.13– 2.50 мл розчину адреналіну з концентрацією 0.182 г/л, додавали боратний буферний розчин до загального об'єму 5.0 мл, перемішували впродовж 10 хв з 0.15 г ТР, декантували та промивали сорбент буферним розчином. Поглинання сорбенту вимірювали в тонкому шарі ($l = 0.1$ см) при $\lambda = 730$ нм та 996 нм, відносно немодифікованого силікагелю. Паралельно вимірювали поглинання сорбенту, обробленого розчином, який не містить адреналіну при тих самих значеннях довжини хвилі.

Рівняння ГГ у координатах « $\Delta A - C_{\text{адреналіну}}$, мг/л» має вигляд:

$$\Delta A = (3.59 \pm 0.06) \cdot 10^{-3} \cdot C_{\text{адреналіну}}, \text{ мг/л} \quad (P = 0.95, n = 7, R = 0.999).$$

Діапазон лінійності зберігається у межах від 4.6 до 92.0 мг/л, межа виявлення, розрахована за $3s$ -критерієм, становить 1.7 мг/л.

Розроблений ТР було застосовано для оцінки вмісту адреналіну у препаратах місцевих анестезій: Бупінекаїн М (ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», м. Київ, Україна), Артифрін-Здоров'я (ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», м. Харків, Україна), Ультракаїн Д-С (Авентіс фарма Дойчланд ГмбХ, Німеччина)

Визначення адреналіну у препаратах місцевих анестезій. У стакан ємністю 25.0 мл вносили розчин препарату (1.7–2.0 мл) та боратний буферний розчин з оптимальним значенням рН до загального об'єму 5.0 мл. До отриманого розчину додавали 0.10 г гідрофобного сорбенту Inerton AW (для вилучення основного компоненту препарату (артикаїн, бупінекаїн), які у лужному середовищі перетворюються в емульсію і заважають ТСФ визначенню), та перемішували впродовж 3 хв. Після цього розчин центрифугували впродовж 3 хв, декантували, додавали 0.15 г ТР та перемішували впродовж 10 хв. Сорбент промивали дистильованою водою, додавали відповідний буферний розчин та вимірювали поглинання сорбенту у тонкому шарі при 730 нм та 996 нм відносно немодифікованого силікагелю. Концентрацію адреналіну у препараті визначали за ГГ.

Таблиця

Результати визначення адреналіну в фармацевтичних препаратах розробленою твердофазною спектрофотометричною методикою

Фармацевтичний препарат	Зазначений вміст, мг/л	Визначений вміст, мг/л	S_r
Бупінекаїн	5	5±1	0.09
Артифрін-Здоров'я	6	6±1	0.08
Ультракаїн Д-С	6	6.1±0.9	0.07

З таблиці видно, що отримані результати характеризуються задовільними правильністю та відтворюваністю. Методика визначення проста та експресна, час аналізу однієї проби не перевищує 20 хв.

Основними перевагами розробленого ТР є можливість застосування його як готової аналітичної форми – індикаторного порошку, стабільного при зберіганні у формі суспензії понад 6 місяців. Взаємодія ТР з адреналіном супроводжується зміною забарвлення сорбенту від жовтого до синього ($\Delta\lambda=385$ нм), що може бути покладено в основу розробки кольорової шкали для візуального тест-визначення катехоламінів. Розроблений ТР може бути перспективним для експрес-контролю якості фармацевтичних препаратів та вмісту катехоламінів у біологічних рідинах.

Список використаної літератури

1. Матлина Э.Ш. Обмен катехоламинов в гормональном и медиаторных звеньях симпато-адреналовой системы при стрессе / Э.Ш. Матлина // Успехи физиол. наук. – 1972. – Т. 3, № 4. – С. 92–130.
2. Расак К. Феохромоцитома: клинические рекомендации 1-го международного симпозиума (ISP) / К. Расак, пер. с англ. Д. Г. Бельцевич // Эндокринная хирургия. – 2007. – № 1. – С. 3–11.
3. Yao H. Flow-injection chemiluminescence determination of catecholamines based on their enhancing effects on the luminol-potassium periodate system / H. Yao, Y. Y. Sun, X. Lin, J. Cheng, L. Huang // Luminescence. – 2006. – Vol. 21, Iss. 2. – P. 112–117.
4. Raj C. R. Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine / C. R. Raj, T. Okajima, T. Ohsaka // J. Electroanal. Chem. – 2003. – V. 543, № 2. – P. 127–133.
5. Leite O. D. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines / O. D. Leite, K. O. Lupetti, O. Fatibello-Filho, I. C. Vieira, A. M. Barbosa // Talanta. – 2003. – Vol. 59, Iss. 5. – P. 889–896.
6. Манухин Б. Н. Адреналин и норадреналин / Б. Н. Манухин. – М.: Наука, 1964. – С. 297–300.
7. Поп М. Т. Гетерополи- и изополикислоты / М. Т. Поп, пер. с англ. Я. А. Мороз, Г. М. Рязанцева. – Новосибирск: Наука. – 1990. – 312 с.
8. Ткач В. І. Використання гетерополіаніонів структури Кеггіна в аналізі органічних та неорганічних сполук / В. І. Ткач, Н. І. Карандєєва, Л. П. Цыганок, А. Б. Вишнікін. – Дніпропетровськ: УДХТУ/ – 2002. – 184 с.
9. Качан І. А. Імобілізовані на кремнеземі іонні асоціати молибденових гетерополікіслот – нові аналітичні форми для визначення Р, Si, Sb, окисників та відновників: дис. кандидата хім. наук: 02.00.02 / І. А. Качан. – К. – 2008. – 160 с.
10. Брыкина Т. Д. Твердофазная спектрофотометрия / Т. Д. Брыкина, Л. С. Крысина, В. М. Иванов // Журн. аналит. химии. – 1988. – Т. 43, № 9. – С. 1547–1560.
11. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии // Справ. изд. – 6-е изд. перераб. и доп. – М.: Химия. – 1989. – С. 274.
12. Запорожец О. А. Имобилизация аналитических реагентов на поверхности носителей / О. А. Запорожец, О. М. Гаер, В. В. Сухан // Успехи химии. – 1997. – Т. 66. – № 7. – С. 703–712.
13. Zaporozhets O. A. Interaction of molybdo-phosphoric and molybdo-antimono-phosphoric heteropoly acids with silica gels modified with aliphatic and heterocyclic quaternary ammonium salts / O. A. Zaporozhets, I. A. Kachan, L. S. Zinko, J. P. Bas, V. I. Davydov // Adsorpt. Sci. Technol. – 2011. – Vol. 29, № 3. – P. – 319–330.
14. Запорожец О. А. Твердофазно-спектрофотометрическое и тест-определение сосуществующих форм фосфора в воде / О. А. Запорожец, Л. С. Зинько, И. А. Качан // Журн. аналит. химии. – 2007. – Т. 62, № 12. – С. 1271–1275.
15. Khan A. S. Phosphate determination by use of molybdoantimonylphosphoric acid and polyurethane foam / A. S. Khan, A. Chow // Talanta. – 1985. – Vol. 32, № 3. – P. 241–243.
16. Цыганок Л. П. Гетерополианионы структуры Кеггина – аналитические формы с регулируемыми свойствами в физико-химических методах анализа / Л. П. Цыганок // Журн. аналит. химии. – 1992. – Т. 47, № 7. – С. 1184–1199.
17. Вишникина Е. В. Определение фосфора реакцией умножения с использованием восстановленной формы 12-молибдофосфата в сталях и сплавах / Е. В. Вишникина, А. Б. Вишникин, Ф. А. Чмиленко // Вопросы химии и хим. технологии. – 2003. – № 1. – С. 14–18.

Одержано редакцією 16.11.2012
 Прийнято до публікації 18.01.2013

Аннотация. Бас Ю. П., Запорожец О. А. Смешанная молибдофосфорностибиевая ГПК как твердофазный аналитический реагент для определения катехоламинов.

Определение катехоламинов имеет большое значение в клинической диагностике болезней, поскольку изменение их концентрации в биологических жидкостях является индикатором многих патологических состояний организма. Весьма чувствительными реагентами для определения катехоламинов являются гетерополикислоты. Однако, имеющиеся спектрофотометрические методики с их использованием характеризуются рядом недостатков, связанных с псевдоколлоидным состоянием реагента в растворе и низкой его устойчивостью во времени. Большинство из них

можно избежать путем переноса аналитической реакции на границу раздела фаз «сорбент – раствор».

Разработан новый окислительно-восстановительный реагент на основе ионного ассоциата «четвертичная аммониевая соль алифатической природы (ЧАС) - смешанная молибдофосфорноантимоновая гетерополикислота» для твердофазно-спектрофотометрического определения катехоламинов. В качестве матрицы был выбран мезопористый силикагель SG-60 фирмы Merck. Твердофазный реагент получен путем извлечения гетерополианиона из водного раствора силикагелем, модифицированным ЧАС в течение 5 мин. Окислительно-восстановительные свойства разработанного твердофазного реагента были проверены при взаимодействии с раствором модельного вещества – адреналина. Линейность градуировочного графика сохраняется в пределах 4.6–92.0 мг/л. Предел обнаружения адреналина, рассчитанный по 3s-критерию, составляет 1.7 мг/л. Разработанный твердофазный реагент был апробирован при анализе фармацевтических препаратов местных анестезий.

Ключевые слова: твердофазный реагент, гетерополикислоты, катехоламины, адреналин, местная анестезия.

Summary. *Bas J. P., Zaporozhets O. A. Mixed molybdo-phosphorus-antimonic heteropoly acid using solid-phase analytical reagents for the determination of catecholamines. Determination of catecholamines is very important for clinical diagnostics of diseases, because the change of their concentrations in biological liquids is an indicator of many pathological states of the organism. The heteropolyacids are highly sensitive reagents for determining of catecholamines. However, the spectrophotometric methods using heteropolyacids are characterized by some disadvantages, related to pseudo colloidal condition of the reagent in solution and its low stability over the time. Most of them can be avoided by the transfer of analytical reactions on the phase boundary "sorbent - solution".*

A new redox reagent based on the ion associate "aliphatic quaternary ammonium salt (QAS) – mixed molybdo-phosphorus-antimonic heteropoly acid" was developed for solid-phase spectrophotometric determination of catecholamines. The mesoporous silica gel SG-60 (Merck) was chosen as the matrix. The solid-phase reagent was created by adsorption of heteropolyanion from water solution onto silica gel modified QAS for 5 minutes. The redox properties of developed solid-phase reagent were tested by interaction with solution of model compound - adrenaline. The calibration curve in the concentration range of 4.6–92.0 mg/l of adrenaline was linear. The detection limit of adrenaline as calculated by the 3s-criterion was 1.7 mg/l. The new solid-phase reagent was tested in the analysis of pharmaceuticals local anesthesia.

Key words: *solid-phase reagent, heteropoly acid, catecholamines, adrenaline, local anesthesia.*