

УДК 543.552+54.062+615.074+544.72

НОВІ ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ СЕНСОРИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДОФАМІНУ В ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТАХ

**А.Б. Ткаченко, Д.М. Верютіна, А.І. Кузьміна, Ю.І. Чуйко, М.О. Оніжук,
О.С. Ткаченко, Р.В. Сухов, М.О. Колосов, А. В.Пантелеймонов**

На основі органо-кремнеземного матеріалу із іммобілізованими фосфоновими групами та сорбованими іонами Cu^{2+} і Fe^{3+} створено електроди для визначення дофаміну. Для електрохімічних вимірювань використано метод диференціально-імпульсної вольтамперометрії. Виявлено, що поверхневі комплекси Cu^{2+} та Fe^{3+} із фосфоновими групами проявляють електрокаталітичну дію на процес окиснення дофаміну.

З використанням отриманих сенсорів розроблено процедури визначення вмісту дофаміну в лікарських препаратах. Діапазон лінійності градуувального графіка становить $0.005 - 1.38 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ (для електроду із іонами Cu^{2+}) та $0.006 - 0.65 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ (для електроду із іонами Fe^{3+}), чутливість 9.1 та $19.2 \text{ мА} \cdot \text{л} \cdot \text{моль}^{-1}$, відповідно, а межа виявлення $0.002 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Електрохімічні сенсори демонструють високу селективність та стабільність.

Процедури апробовано на комерційних фармацевтичних об'єктах. Правильність результатів аналізу підтверджено незалежним методом.

Ключові слова: електрохімічний сенсор, органо-кремнеземний матеріал, фосфонові групи, дофамін, вольтамперометрія.

Вступ

Дофамін (рис. 1), представник групи катехоламінів, має властивості адренергічних речовин. Застосовується в медичній практиці при шоккових станах різної етіології [1], у випадках дуже низького кров'яного тиску, серцебиття [2]. Контроль якості медичних препаратів, що включають дофамін, є необхідним етапом їх виробництва в фармацевтичній промисловості. Поява нових ліків, лікарських форм зумовлює необхідність розробки відповідних процедур визначення або модифікацію вже існуючих.

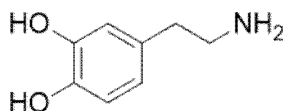


Рисунок 1. Структурна формула дофаміну

Одним із швидких і дешевих методів сучасного аналізу є вольтамперометрія [3,4]. Розробка нових робочих електродів дозволяє розширити коло аналітів і межі визначення в цьому методі. Особливий інтерес викликає моніторинг вмісту органічних речовин у фармацевтичних препаратах, харчових продуктах і сировині, біологічних середовищах [4-7].

Важливим розділом сучасного хімічного матеріалознавства є синтез гібридних органо-кремнеземних матеріалів, що мають практичне застосування в електрохімічному аналізі, а саме є основою для створення робочих електродів [8]. Такі електроди дозволяють визначати концентрації речовин в межах мікро- та наномоль л^{-1} , володіють високими чутливістю та селективністю по відношенню до досліджуваних речовин.

В даній роботі новосинтезований органо-кремнеземний матеріал з іммобілізованими фосфоновими групами та сорбованими іонами Cu^{2+} та Fe^{3+} був використаний для виготовлення електрохімічних сенсорів для визначення дофаміну.

Експериментальна частина

Вихідні реагенти. Для синтезу органо-кремнеземних матеріалів використовували без попереднього очищення такі реагенти: 3-амінопропілтриетоксисилан (АПТЕС), тетраетоксисилан (ТЕОС) (Merck, >98%), диетилфосфіт, дихлорметан, ацетон, 4-(N,N-диметил)амінопіридин (ДМАП) та цеоліти СаА і NaА (всі ХімЛаборРеактив, >98%).

Під час синтезу матеріалів та проведення експериментів використовували такі розчинники: толуол (ХімЛаборРеактив, 99.5%), етанол (Дубов'язівський спиртовий завод, 96%) та бідистильовану воду.

В електрохімічних вимірюваннях використовували: чистий графіт (Aldrich, 99.99%) для виготовлення диск-таблеток електродів; дофамін-гідрохлорид (ХімЛаборРеактив, 99%) для приготування розчинів аналітів; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ХімЛаборРеактив, 98%), як донор електроактивної частинки при модифікуванні електродів; KCl (ХімЛаборРеактив, 99%) для підтримування постійної іонної сили.

Хлорна кислота (ХімЛаборРеактив, 70%) була стандартизована за методикою [9]. Безводні розчини мурашиної та оцтової кислот (обидві ХімЛаборРеактив, 98%) використовували для потенціометричного титрування.

Стандартний буферний розчин (pH=6.86) був приготований розчиненням відповідного фіксаналу в бідистильованій воді; pH робочих розчинів регулювали додаванням розчину NaOH або HCl (всі ХімЛаборРеактив, 99%).

Розчин NaCl, NaSO_3 , аскорбінової кислоти та глюкози (ХімЛаборРеактив, всі 99%) готували розчиненням точної наважки в 1 М розчині KCl.

Синтез матеріалу. Матеріал $\text{SiO}_2 \sim \text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ добули методом золь-гель синтезу за такою схемою (рис. 2). Синтез проводили в атмосфері аргону. Суміш ацетону (29 ммоль, 1.7 г), цеолітів (5 г) та 50 мл толуолу перемішували за кімнатної температури упродовж 10 хв, після чого додавали АПТЕС (3 г, 13.6 ммоль) і перемішували упродовж 12 год за кімнатної температури. Далі відфільтровували через тонкий шар (1 см) SiO_2 для видалення цеолітів та промивали дихлорметаном. Після видалення розчинника при зниженому тиску отримали темно-жовту рідку сполуку. Суміш отриманої сполуки (3.5 г, 13.4 ммоль), диетилфосфіту (3.7 г, 26.8 ммоль) та 4-(N,N-диметил)амінопіридину (0.16 г, 1.3 ммоль) перемішували при температурі водяної бані 100°C упродовж 5 год. Надлишок диетилфосфіту видаляли при зниженому тиску. Отриману коричневу рідину (5.35 г, 100%) використовували як органічний модифікатор. Далі, суміш із 20 мл етанолу, 20 мл ТЕОС, 10 мл H_2O нагрівали до 50°C і перемішували упродовж 15 хв. Далі додавали 1.5 мл органічного модифікатора і продовжували перемішування упродовж 45 хв. Потім додавали 1 мл 25%-го розчину NH_3 та продовжували перемішування 1.5 год до випадіння білого порошку. Далі отриманий порошок відфільтровували через лійку Бюхнера, промивали 20 мл H_2O та висушували до постійної маси при 90°C в сушильній шафі. Білий порошок (масою 1 г) суспендували в 10 мл розчину конц. HCl, а потім кип'ятили упродовж 10 год. Далі суміш охолоджували до кімнатної температури та нейтралізували 5%-вим розчином NaOH до pH 7-7.5. Осад відфільтровували через лійку Бюхнера та промивали водою. Отриманий матеріал висушували у сушильній шафі при 80°C до постійної маси.

Прилади та методи вимірювання. Для вимірювання pH використовували коло з переносом, що містило скляний електрод ЕС-10603 з водневою функцією («Вимірювальна техніка»), хлорсрібний електрод порівняння ЕВЛ-1М3 (Гомельський завод вимірювальних приладів) та сольовий місток, заповнений насиченим розчином KNO_3 в агар-агарі. Значення pH реєстрували за допомогою лабораторного іоніміру U-160 Ми («Вимірювальна техніка»). Стандартні відхилення не перевищували 0.03 pH, а величина суспензійного ефекту не перевищувала 0.1 pH.

Електрохімічні вимірювання проводили на потенціостаті / гальваностаті Р-30І (ЕлІнс) з використанням трьохелектродної схеми: електроду порівняння (насичений хлорсрібний електрод), допоміжного електроду (платиновий дріт) та робочого електроду. Використовували метод диференціально-імпульсної вольтамперометрії (ДІВ). Вимірювання здійснювали в діапазоні потенціалів від -0.2 до 1.0 В відносно хлорсрібного електроду порівняння з такими характерис-

тиками: величина імпульсу – 50 мВ, крок на кожному імпульсі – 10 мВ, тривалість імпульсу – 0.4 с, інтервал між імпульсами – 0.9 с.

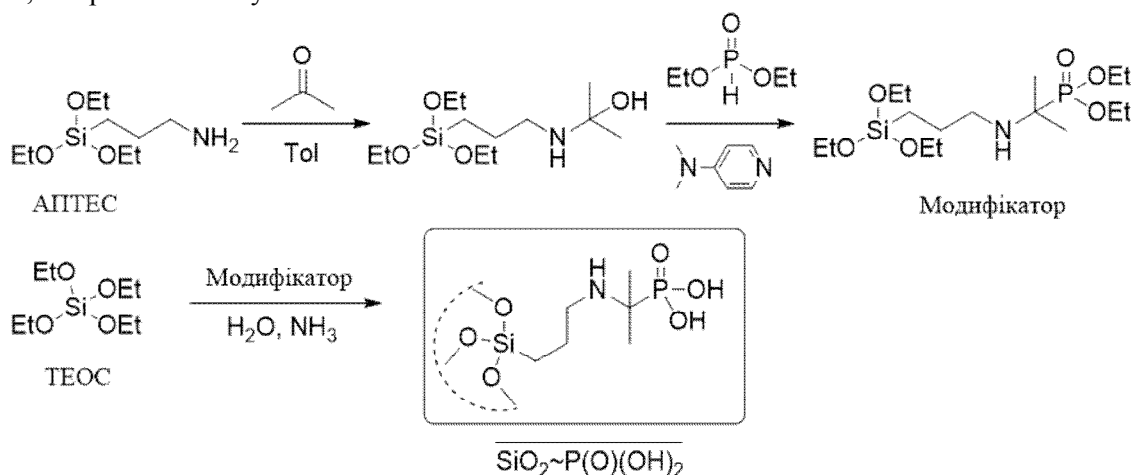


Рисунок 2. Схема синтезу орґано-кремнеземного матеріалу

Метод потенціометричного титрування використовували для визначення концентрації дофамін гідрохлориду в лікарських препаратах. 0.150 г субстанції розчиняють у 10 мл безводної мурашиної кислоти, додають 50 мл безводної оцтової кислоти і титрують 0.1 М розчином хлорної кислоти потенціометрично. 1 мл 0.1 М розчину хлорної кислоти відповідає 18.96 мг дофамін гідрохлориду [10].

Виготовлення робочих електродів. Робочий електрод виготовляли таким чином. Суміш із рідких за масою порцій (по ~ 30 мг) порошкоподібного графіту та орґано-кремнеземного матеріалу (див. далі) ретельно перемішували в агатовій ступці, потім спресовували в таблетки під тиском 12.13 МПа. Отриманий диск-таблетку розміром 5 мм в діаметрі та ~ 2 мм товщиною витримували в рідкому парафіні упродовж 10 хв для видалення адсорбованих газів. Запарафінований диск-таблетку приклеювали на кінець скляної трубки (5 мм в діаметрі, 150 мм довжиною) і залишали на 24 год для висихання клею. Електрохімічний контакт здійснювався за допомогою мідного дроту, який розміщувався всередині скляної трубки і з'єднувався з таблеткою через графітовий порошок. Перед кожним експериментом поверхню робочих електродів активували шліфувальним папером. Всі вимірювання проводили при кімнатній температурі (20°C) в 1 М розчині KCl.

Було виготовлено три різні електроди: з чистого матеріалу $\text{SiO}_2 \sim \text{P(O)(OH)}_2$ (SiPON/C) та два з матеріалу на поверхні якого шляхом сорбції закріплено іони Cu^{2+} (SiPON/Cu/C) і іони Fe^{3+} (SiPON/Fe/C).

Іони Cu^{2+} та Fe^{3+} на поверхні матеріалу $\text{SiO}_2 \sim \text{P(O)(OH)}_2$ закріплювали таким чином. ~0.05 г матеріалу суспендували в 25 мл водного розчину CuSO_4 (1.5 ммоль л⁻¹) або FeCl_3 (0.8 ммоль л⁻¹), рН яких підтримувалося на рівні 5.8±0.2 (для розчину Cu^{2+}) та 1.9 (для розчину Fe^{3+}) за допомогою розчину HCl (2 моль·л⁻¹). Системи перемішували на шейкері впродовж 72 год. Далі тверду фазу відфільтровували і висушували при кімнатній температурі, а залишкову концентрацію іонів металів у розчинах визначали за допомогою комплексометричного титрування розчином Трилону Б відповідно до методик [9]. Поверхнева концентрація іонів становила 0.3 ммоль г⁻¹ для Cu^{2+} та 0.07 ммоль г⁻¹ Fe^{3+} .

Результати та їх обговорення

Електрокаталітичне окиснення дофаміну на електродах. На рис. 3 наведено вольтамперограмні криві електродів SiPON/C, SiPON/Cu/C і SiPON/Fe/C в 1 М розчині KCl (рН 6.6) за відсутності та в присутності ~0.1 ммоль л⁻¹ дофаміну.

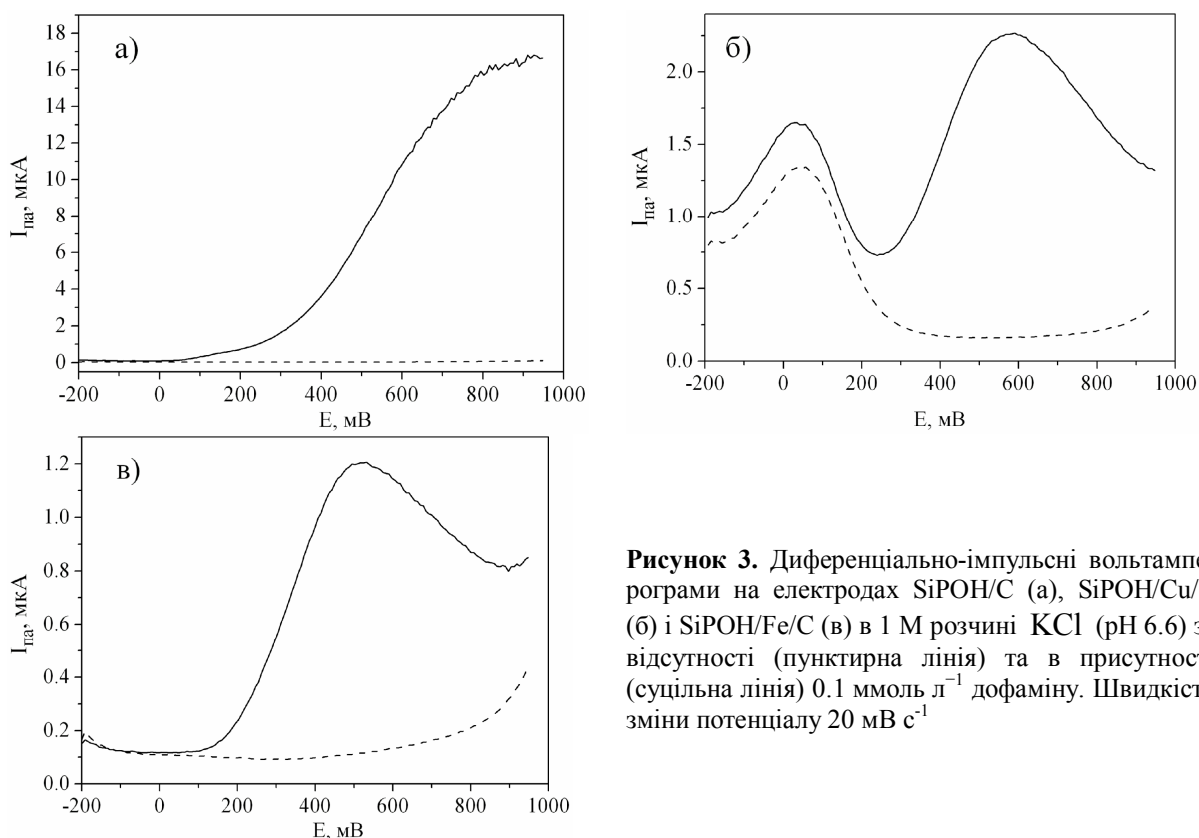


Рисунок 3. Диференціально-імпульсні вольтамперограми на електродах SiPOH/C (а), SiPOH/Cu/C (б) і SiPOH/Fe/C (в) в 1 М розчині KCl (рН 6.6) за відсутності (пунктирна лінія) та в присутності (суцільна лінія) 0.1 ммоль л⁻¹ дофаміну. Швидкість зміни потенціалу 20 мВ с⁻¹

На кривій електрода SiPOH/C (рис. 3а) при додаванні дофаміну сила струму різко збільшується на ділянці високих потенціалів, проте така смуга не має чіткого максимуму та не може бути використана як аналітичний сигнал. Тому, далі цей електрод не використовували.

Як видно з рис. 3б та 3в, при введенні в систему дофаміну на кривих вольтамперограм з'являються піки з максимум при 600 мВ для SiPOH/Cu/C та при 500 мВ для SiPOH/Fe/C, які відповідають електрохімічному окисненню дофаміну. Отже, обидва електроди є чутливими до дофаміну.

Порівнюючи вольтамперограми трьох електродів в розчинах дофаміну, можна виявити, що поверхневі комплекси іонів Cu²⁺ та Fe³⁺ із іммобілізованими фосфоновими групами проявляють електрокаталітичну дію на процес окиснення дофаміну.

Варто відзначити, що присутність піка на кривій для SiPOH/Cu/C обумовлене процесом окиснення іонів Cu⁺ до Cu²⁺.

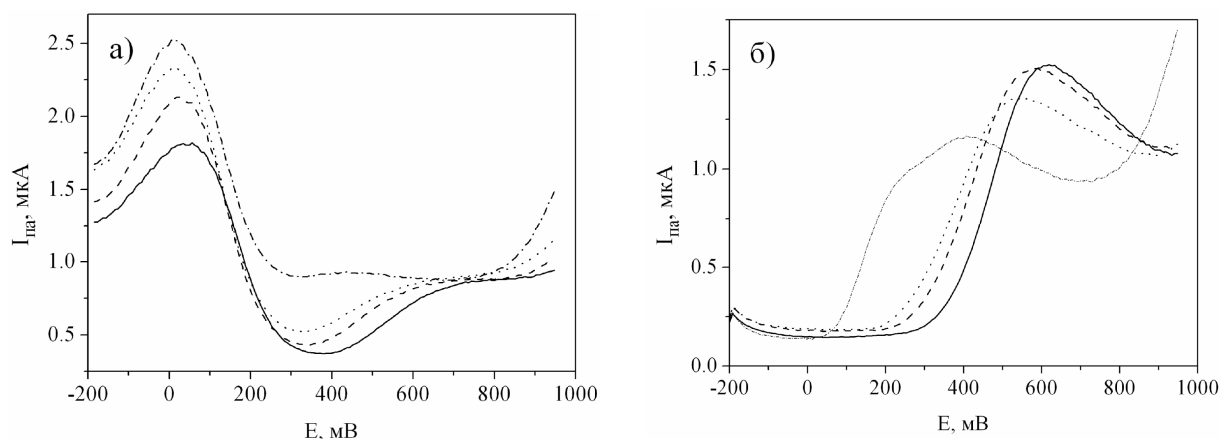


Рисунок 4. Диференціально-імпульсні вольтамперограми на електродах SiPOH/Cu/C (а) і SiPOH/Fe/C (б) в 1 М розчині KCl з рН 3.43 (суцільна лінія), 4.42 (штрихова лінія), 5.15 (пунктирна лінія), 7.12 (штрих-пунктирна лінія). Концентрація дофаміну 1 · 10⁻⁵ моль л⁻¹ для SiPOH/Cu/C і 1 · 10⁻⁴ моль л⁻¹ для SiPOH/Fe/C

Як видно з вольтамперограм, в слабколужних розчинах не вдається зафіксувати чіткий аналітичний сигнал на обох електродах. Отже, електроди не є придатними для використання в таких середовищах.

На вольтамперограмах для слабкокислих розчинів пік окиснення дофаміну має чітку форму, що дозволяє використовувати його як аналітичний сигнал, а розчини – як такі, що є оптимальними для визначення дофаміну. Оскільки інтенсивність та форма аналітичного сигналу на електродах в слабкокислих розчинах та в розчині KCl (рис. 4) співпадають, то далі для спрощення експерименту вимірювання проводили лише в розчині KCl.

Процедура визначення дофаміну. Для побудови калібрувальних графіків було проведено низку вимірювань. За допомогою електродів записували вольтамперометричну криву в 25 мл 1 М розчину KCl. Далі в систему послідовно вводили декілька порцій аліквоти робочого розчину дофаміну (по 0.05 мл кожна). Після додавання кожної порції аліквоти систему перемішували 20 с та реєстрували вольтамперограму (рис. 5а та 6а). Калібрувальний графік (рис. 5б та 6б) будували у координатах «I - C(доф.), моль л⁻¹», де I – величина сили струму в максимумі піку окиснення, а C(доф.) – концентрація дофаміну в розчині.

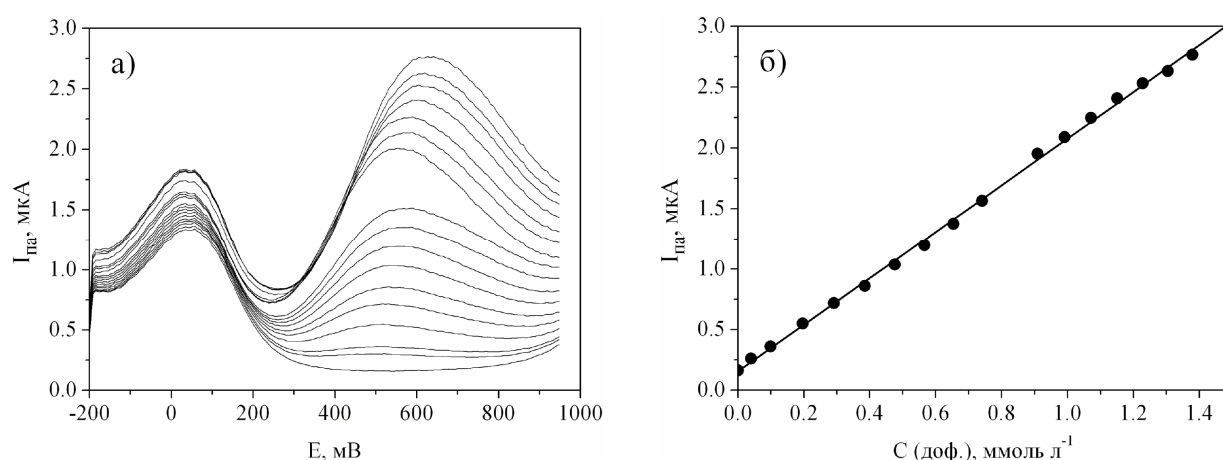


Рисунок 5. а) Диференціально-імпульсні вольтамперограми на електроді SiPON/Cu/C для розчинів, що містять від 0.04 до 1.38 ммоль л⁻¹ дофаміну. б) калібрувальний графік

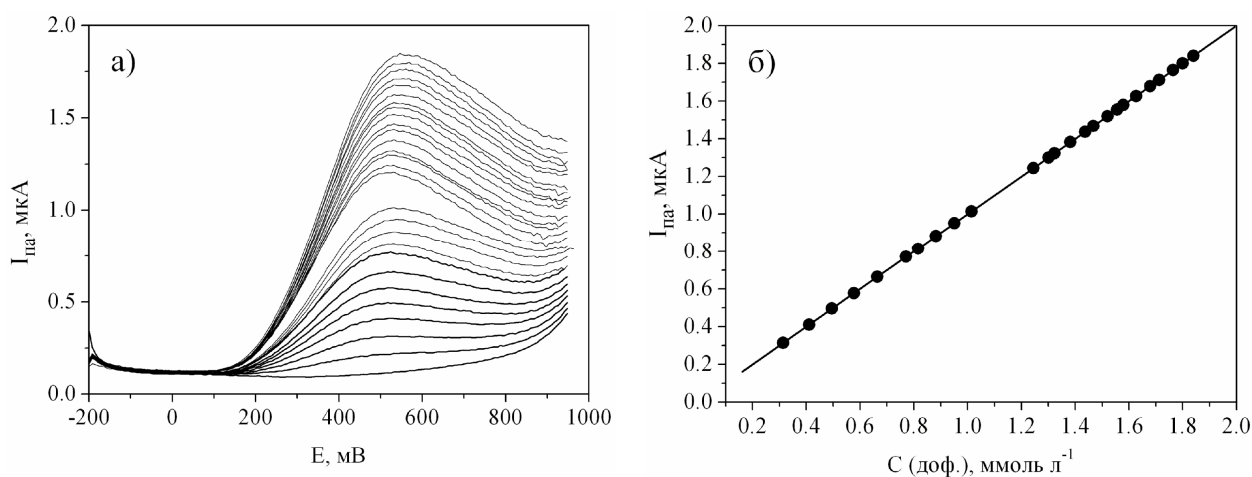


Рисунок 6. а) Диференціально-імпульсні вольтамперограми на електроді SiPON/Fe/C для розчинів, що містять від 0.03 до 0.65 ммоль л⁻¹ дофаміну. б) калібрувальний графік

Повторюваність (П, %) [12] визначали з п'яти експериментів, проведених в один день, в одній і тій же електрохімічній комірці з однаковими розчинами, що містили 10⁻⁴ моль л⁻¹ дофаміну.

Відтворюваність (В, %) [12] процедури визначали за допомогою низки експериментів з п'ятьма різними електродами приготовленими за однією і тією ж методикою.

Розраховані метрологічні параметри процедури визначення дофаміну наведені в табл. 1.

Таблиця 1. Метрологічні характеристики процедури визначення дофаміну з (n=3, P=0.95)

Електрод	Діапазон лінійності, ммоль л ⁻¹	МВв, ммоль л ⁻¹	Чутливість, нА л мкмоль ⁻¹	П, %	В, %
SiPOH/Cu/C	0.005 - 1.38	0.002	9.1	1.3	5.1
SiPOH/Fe/C	0.006 - 0.65	0.002	19.2	1.4	5.1

Вплив різних іонів та речовин на визначення дофаміну. Було встановлено, що на аналітичний сигнал на електродах не впливають такі кратні кількості речовин: натрій хлорид та натрій сульфід (≤ 1000), глюкоза (≤ 800) та аскорбінова кислота (≤ 50).

Правильність процедури визначення дофаміну. Готували серію розчинів із вмістом дофаміну 0.09, 0.22, та 0.60 ммоль л⁻¹. Електрохімічні вимірювання проводили як описано вище. Вміст дофаміну знаходили за калібрувальним графіком. Результати визначення наведено в табл. 2.

Таблиця 2. Результати перевірки правильності процедури визначення дофаміну за допомогою електродів (n = 3, P = 0.95).

Введено доф., ммоль л ⁻¹	Електрод SiPOH/Cu/C		Електрод SiPOH/Fe/C	
	Знайдено доф., ммоль л ⁻¹	Правильність, %	Знайдено доф., ммоль л ⁻¹	Правильність, %
0.09	0.089 ± 0.001	99 ± 1	0.091 ± 0.001	101 ± 1
0.22	0.221±0.001	100±1	0.220±0.004	100±1
0.60	0.599±0.001	99±1	0.589±0.001	98±2

Електрохімічне визначення дофаміну в медичних препаратах. Для визначення вмісту дофаміну в препаратах «Дофамін-Дарниця» (ЗАТ «Фармацевтична фірма» Дарниця) та «Dopamine» (Ogion Corporation) використали метод стандартних добавок.

1.25 мл аліквоти препарату перенесли в мірну колбу, об'ємом 25мл, і доводили до мітки 1М розчином KCl. Приготовані розчини використовували як робочі.

Встановлено, що допоміжні компоненти, соляна кислота та натрій метабісульфіт (який у водних розчинах перетворюється на натрій сульфід) не впливають на аналітичний сигнал при електрохімічному окисненні дофаміну на електродах.

Результати визначення дофаміну в ліках за розробленою процедурою корелюють із даними потенціометричного титрування (табл. 3). Оскільки, визначення дофаміну у субстанції стандартним методом вимагає використання хлорної та безводних мурашиної і оцтової кислот, оцтового ангідриду, які є токсичними та шкідливими для організму, а останній є прекурсором, то розроблена нами процедура є більш безпечною та доступною.

Таблиця 3. Результати визначення дофаміну в лікарських препаратах.

Метод	«Дофамін-Дарниця»		«Dopamine»	
	С _{заявлено} , г л ⁻¹	С _{виявлено} , г л ⁻¹	С _{заявлено} , г л ⁻¹	С _{виявлено} , г л ⁻¹
Електрохімічне визначення SiPOH/Cu/C SiPOH/Fe/C	40.00	39.8 ± 0.2	40.00	39.6 ± 0.2
		40.0 ± 0.2		39.9 ± 0.2
Потенціометричне титрування		39.7 ± 0.2		39.5 ± 0.1

Висновки

На основі органо-кремнеземного матеріалу із іммобілізованими фосфоновими групами та з сорбованими іонами Cu²⁺ і Fe³⁺ створено електрохімічні сенсори для визначення дофаміну. Розроблені процедури характеризується такими метрологічними характеристиками: діапазон лінійності 0.005 - 1.38 ммоль л⁻¹, межа виявлення 2 мкмоль л⁻¹, відтворюваність та повторюваність становлять ~5 та ~1.35 %, відповідно. Процедури верифіковано за допомогою методу «введено-знайдено», відносне стандартне відхилення не перевищує 1 %. Виявлено, що визначенню не заважають такі іони та речовини (кратні кількості): натрій хлорид (≤ 1000), глюкоза (≤ 800)

та аскорбінова кислота (≤ 50). Процедури апробовано на лікарських препаратах. Результати співпадають із даними потенціометричного титрування.

Литература / References

1. J.R. Walters, D.N. Ruskin, K.A. Allers, D.A. Bergstrom // In Trends in Neurosciences. – 2000. 23. – P. S41 S47
2. S.I. Bhayat, H.M. Gowda, M. Eisenhut // World Journal of Clinical Pediatrics. – 2016. – 5. – P. 212 222
3. Y. Lu, X. Liang, Ch. Niyungeko, J. Zhou, J. Xu, G. Tian // Talanta. – 2018. – 178. – P. 324 – 338
4. H. Tian, Y. Li, H. Shao, H.-Z. Yu // Analytica Chimica Acta. – 2015. – 855. – P. 1 12
5. G. Herzog, V. Beni // Analytica Chimica Acta. – 2013. – 769. – P. 10 21
6. Y. Zhang, Q. Wan, N. Yang // Electrochimica Acta. – 2017. – 231. – P. 300 308
7. Z. Mofidi, P. Norouzi, S. Seidi, M.R. Ganjali // Analytica Chimica Acta. – 2017. – 972. – P. 38–45
8. M.M. Collinson // Trends in Analytical Chemistry. – 2002. – 42. – P. 31–39
9. J.S. Fritz, G.H. Schenk // Quantitative analytical chemistry. – 1987. – 5th ed. Prentice Hall NJ. – 690 p
10. World Health Organization // European Pharmacopoeia. – 2010. – 7th ed. WHO Press.
11. L.A. Currie // Pure and Applied Chemistry. – 1995. – 67. – P. 1699–1723
12. O. Tkachenko, A. Rahim, A. Baraban, R. Sukhov, I. Khristenko, Y. Gushikem, Y. Kholin // Journal of Sol-Gel Science and Technology. 2013. – 67. P. 145–154

Поступила до редакції 10 листопада 2017 р.

А.Б. Ткаченко, Д.М. Верютіна, А.І. Кузьміна, Ю.І. Чуйко, Н.О. Оніжук, О.С. Ткаченко, Р.В. Сухов, М.А. Колосов, А.В. Пантелеймонов. Новые электрохимические сенсоры для определения дофамина в лекарственных препаратах.

На основе органо-кремнеземного материала с иммобилизованными фосфоновыми группами и сорбированными ионами Cu^{2+} и Fe^{3+} созданы электроды для определения дофамина. Для электрохимических измерений использован метод дифференциально-импульсной вольтамперометрии. Обнаружено, что поверхностные комплексы Cu^{2+} и Fe^{3+} с фосфоновыми группами проявляют электрокаталитическое действие на процесс окисления дофамина.

С использованием полученных сенсоров разработаны процедуры определения содержания дофамина в лекарственных препаратах. Диапазон линейности калибровочного графика составляет 0.005 - 1.38 ммоль л^{-1} (для электрода с ионами Cu^{2+}) и 0.006 - 0.65 ммоль л^{-1} (для электрода с ионами Fe^{3+}), чувствительность 9.1 и 19.2 мА л^{-1} ммоль $^{-1}$, соответственно, а предел обнаружения 0.002 ммоль л^{-1} . Электрохимические сенсоры демонстрируют высокую селективность и стабильность.

Процедуры апробировано на коммерческих фармацевтических объектах. Правильность результатов анализа подтверждено независимым методом.

Ключевые слова: электрохимический сенсор, органо-кремнеземный материал, фосфоновые группы, дофамин, вольтамперометрия.

A.B. Tkachenko, D.M. Veriutina, A.I. Kuzmina, Yu.I. Chuiko, M.O. Onizhuk, O.S. Tkachenko, R.V. Sukhov, M.O. Kolosov, A.V. Panteleimonov. New electrochemical sensors for dopamine determination in drugs.

The electrodes based on silica-organic materials with immobilized phosphonic groups and sorbed ions of Cu^{2+} and Fe^{3+} were created for dopamine determination. The technique of differential pulse voltammetry was used for electrochemical measurements. It was found, that surface complexes of Cu^{2+} or Fe^{3+} and phosphonic groups have electrocatalytic effect on dopamine oxidation.

The procedures for dopamine content determination in medicine using the obtained sensors were developed. The analytical range is 0.005 - 1.38 mmol L⁻¹ (for electrode with Cu²⁺ ions) and 0.006 - 0.65 mmol L⁻¹ (for electrode with Fe³⁺ ions), sensitivity – 9.1 and 19.2 mA L mol⁻¹, correspondingly, and limit of detection - 0.002 mmol L⁻¹. Electrochemical sensors show high selectivity and stability.

The procedures tested on commercial pharmaceutical facilities. The measurement trueness was confirmed by independent methods.

Keywords: electrochemical sensors, silica-organic material, phosphonic groups, dopamine, voltammetry.

Kharkov University Bulletin. Chemical Series. Issue 29 (52), 2017