

Д. А. Волоцкая, Э. П. Медянцева, Э. Р. Валиева, Р. М. Варламова,
А. Н. Фаттахова, Г. К. Будников

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ – ПРОИЗВОДНЫХ НИТРОФУРАНОВОГО РЯДА С ПОМОЩЬЮ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО МОНОАМИНОКСИДАЗНОГО БИОСЕНСОРА

Казанский государственный университет, Казань, Россия; e-mail: Elvina.Medyantseva@ksu.ru

Разработан способ определения лекарственных соединений нитрофуранового ряда (фуразолидона, фурадонина и фурагина) с помощью предлагаемого амперометрического биосенсора на основе платинового печатного электрода и иммобилизованной моноаминоксидазы в лекарственных препаратах и моче. Установлено, что производные нитрофуранового ряда оказывают, хотя и более слабое по сравнению с классическими трициклическими антидепрессантами, но ингибирующее действие на каталитическую активность моноаминоксидазы. Показана возможность определения фуразолидона, фурадонина и фурагина с нижней границей определяемых содержаний $8,3 \cdot 10^{-9}$, $8,5 \cdot 10^{-8}$ и $9,4 \cdot 10^{-10}$ моль/л соответственно по их побочному ингибирующему действию. Полученные результаты показывают, что такое побочное действие фуразолидона, фурадонина и фурагина необходимо учитывать при назначении больным соответствующих препаратов.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, моноаминоксидаза (МАО), производные нитрофуранового ряда, печатные электроды.

Известно, что многие производные нитрофуранового ряда используются в качестве противомикробных средств широкого спектра действия при лечении инфекционных заболеваний, вызываемых грамположительными и грамотрицательными бактериями, а также некоторыми крупными вирусами, трихомонадами, лямблиями [1]. Их широко применяют при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний мочеполовой сферы: цистита, уретрита, пиелонефрита, пиелита и т.д. К таким лекарственным препаратам относятся, в частности, фуразолидон, фурадонин и фурагин. Имеются литературные данные о моноаминоксидазной активности фуразолидона [1]. Такое его свойство отмечено в соответствующих инструкциях по применению данного лекарственного препарата. Однако для других производных нитрофурана это действие не всегда находит отражение в соответствующих описаниях применения.

В то же время способностью уменьшать каталитическую активность моноаминоксидазы (МАО) обладают лекарственные соединения, относящиеся к классу антидепрессантов [2].

В настоящее время определение производных нитрофуранового ряда основано чаще всего на методах хроматографии, в том числе и в сочетании с масс-спектрометрией [3–7], что однако не всегда обеспечивается быстрой пробоподготовкой, не удовлетворяет требованиям экспрессности и простоты выполнения анализа при достаточно низком пределе обнаружения.

На сегодняшний день одним из современных подходов к анализу фармацевтических препаратов является применение различных биосенсоров [8–10]. Несомненно, это обеспечивает необходимую чувствительность и, в отдельных случаях, селективность опреде-

лений. Моноаминоксидазные биосенсоры пока не нашли широкого применения для определения эффекторов МАО. В то же время в литературе встречаются единичные работы, посвященные, в основном, определению биогенных аминов с помощью соответствующих моноаминоксидазных биосенсоров [11, 12]. Информации об определении лекарственных соединений, оказывающих влияние на МАО крайне мало [13]. Ранее нами был разработан амперометрический биосенсор на основе иммобилизованной МАО и стеклоуглеродного электрода [14], который успешно был применен для определения антидепрессантов петилила и пиразидола. Одна из современных тенденций при разработке биосенсоров — использование в качестве первичного преобразователя электродов, изготовленных по screen-printed технологии. Нами разработан моноаминоксидазный биосенсор на основе платиновых планарных электродов и иммобилизованной на рабочей поверхности электродов МАО [15].

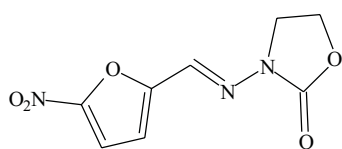
Представляет интерес изучение влияния соединений нитрофуранового ряда (фуразолидона, фурадонина и фурагина) на иммобилизованную МАО и разработка приемов их определения с помощью моноаминоксидазных биосенсоров в лекарственных препаратах и в биологических жидкостях.

Экспериментальная часть

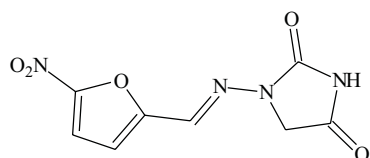
Основой моноаминоксидазного биосенсора служила система, состоящая из рабочего, вспомогательного электродов и электрода сравнения, полученная на керамической подложке методом печатных технологий (фирма BVT Technologies, Брно, Чехия) [16]. Материалом электрода, на котором иммобилизуются ферменты, является платиносодержащая паста. Из платины

изготовлен и вспомогательный электрод. Электродом сравнения служил серебряный электрод. Объем рабочей ячейки системы составлял 120 мкл. Все измерения проводятся с помощью многоцелевого электрохимического детектора “МЕВ” с компьютеризированным управлением. В качестве субстрата применяли 0,5 % раствор дофамина фармацевтической фирмы “Дарница” (Украина), растворы которого готовили разбавлением в рабочем буферном растворе. Применяли MAO из мозга человека с активностью 0,075 мкмоль/мин · мг, предоставленную кафедрой биохимии Казанского государственного университета. Использовали ацетатный буферный раствор pH (5,5), приготовленный из препаратов высокой чистоты.

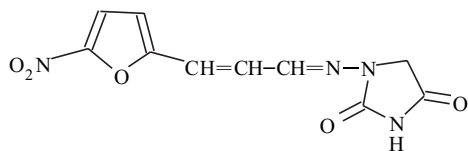
Растворы фуразолидона, фурадонина, фурагина готовили путем их растворения в бидистиллированной воде.



Фуразолидон (N-(5-нитро-2-фулфурилиден)-3-аминооксазолидон-2)



Фурадонин (N-(5-нитро-2-фулфурилиден)-1-аминогидантоин)



Фурагин (N-(5-нитро-2-фурил)аллилиденаминогидантоин)

Биочувствительную часть амперометрического моноаминоксидазного биосенсора на основе печатного платинового электрода готовили аналогично описанию в работе [15].

Результаты и их обсуждение

Ранее показано [14], что MAO катализирует реакцию окислительного дезаминирования дофамина. По-

этому в роли детектирующей системы удобно применять фермент-субстратную систему MAO типа А — дофамин. Использование в качестве основы моноаминоксидазного биосенсора платинового планарного электрода показало, что аналитическим сигналом может служить ток окисления пероксида водорода при потенциале 0,8 В при концентрации субстрата $1 \cdot 10^{-3}$ М и pH фонового электролита 5,5. Условия регистрации аналитического сигнала были те же, что и в работе [14].

Лекарственные препараты нитрофуранового ряда — фуразолидон, фурадонин и фурагин — являются структурными аналогами и обладают во многих аспектах сходным терапевтическим эффектом. Изучение электрохимического поведения дофамина с помощью моноаминоксидазного биосенсора в присутствии соединений нитрофуранового ряда показало, что не только фуразолидон, но и фурадонин, и фурагин вызывают уменьшение величины аналитического сигнала при потенциале 0,8 В. Это указывает на то, что изучаемые соединения также обладают свойствами ингибиторов MAO. При этом изменение аналитического сигнала пропорционально изменению концентрации рассматриваемых нитрофурановых производных. Аналитические возможности моноаминоксидазного биосенсора в определении рассматриваемых лекарственных соединений представлены в табл. 1. Правильность определения производных нитрофуранового ряда с помощью моноаминоксидазного биосенсора была оценена на модельных растворах способом “введено — найдено” (табл. 2).

Результаты сопоставления величины каталитической активности в присутствии таких лекарственных препаратов, как фуразолидон и фурадонин, показывают, что их побочное антимоноксидазное действие достаточно хорошо проявляется при действии на иммобилизованную MAO, отличаясь от действия наиболее часто применяемых антидепрессантов, например, петилила, лишь по величине степени ингибирования (табл. 3.). Полученные результаты показывают, что рассматриваемые лекарственные препараты обладают более слабым антимоноксидазным действием, чем классические трициклические антидепрессанты. Очевидно, что наличие наблюдаемого эффекта

Таблица 1
Аналитические возможности определения производных нитрофуранового ряда с помощью моноаминоксидазного биосенсора ($n = 6, P = 0,95$)

Область рабочих концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости $I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \lg C$, коэффициент корреляции, r			c_{II} , моль/л
	$A \pm \delta$	$(B \pm \delta) \cdot (-\lg C)$	r	
Фуразолидон $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-8}$	(92 ± 3)	$-(11,5 \pm 0,6) (-\lg C)$	0,9964	$8,3 \cdot 10^{-9}$
Фурадонин $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-7}$	(59 ± 3)	$-(7,2 \pm 0,5) (-\lg C)$	0,9922	$8,5 \cdot 10^{-8}$
Фурагин $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-9}$	(80 ± 5)	$-(8,8 \pm 0,7) (-\lg C)$	0,9936	$9,4 \cdot 10^{-10}$

$I^* = (I_1/I_0) \cdot 100\%$, где I_1 — ток реакции окисления пероксида водорода с ингибитором, I_0 — ток окисления пероксида водорода в отсутствие ингибитора.

Таблица 2
Результаты определения фуразолидона, фурадонина и фурагина с помощью биосенсора на основе ИМАО ($n = 6, P = 0,95$)

Препарат	Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r
Фуразолидон	$5 \cdot 10^{-5}$	$(4,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	0,045
	$6 \cdot 10^{-5}$	$(6,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	0,032
	$7 \cdot 10^{-5}$	$(6,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	0,060
Фурадонин	$3 \cdot 10^{-4}$	$(3,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	0,063
	$3 \cdot 10^{-5}$	$(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	0,068
	$3 \cdot 10^{-6}$	$(2,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	0,138
Фурагин	$5 \cdot 10^{-6}$	$(4,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	0,043
	$7 \cdot 10^{-6}$	$(6,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	0,029
	$8 \cdot 10^{-6}$	$(8,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	0,037

обязательно должно учитываться при терапевтических назначениях.

Методика определения содержания производных нитрофуранового ряда в таблетках

Лекарственные препараты нитрофуранового ряда представляют собой таблетки желтого цвета, в состав которых, согласно фармацевтическим данным, наряду с активным действующим компонентом входят кукурузный крахмал, сахарная пудра, силикагель, стеариновая кислота и некоторые другие наполнители. Наличие этих компонентов затрудняет растворение таблеток, с одной стороны; с другой стороны, требует специальных методов отделения раствора от осадка.

Таблетку фуразолидона, фурадонина, фурагина растирали в порошок, растворяли в небольшом количестве спирта (10 %) и дистиллированной воде в объеме 50 мл. После центрифугирования надосадочную жидкость использовали для приготовления рабочих водных растворов путем последовательного разбавления. Для этого аликвоту раствора от 500 до 10 мкл переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили водой до метки. Для этого в ячейку с моноаминоксидазным биосенсором на 120 мкл вносили 104,3 мкл ацетатного буфера, 1,2 – 12 мкл раствора лекарственного препарата и раствор инкубировали 10 мин. Затем добавляли 3,7 мкл субстрата (дофамина) с концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ М и измеряли значение тока при потенциале + 0,8 В.

Содержание производных нитрофуранового ряда в таблетках определяли по градуировочному графику (табл. 1). Полученные результаты представлены в табл. 4.

Определение производных нитрофуранового ряда в моче

Производные нитрофуранового ряда чаще всего применяются для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний мочеполовой сферы. Поэтому с целью разработки методов контроля за содержанием производных нитрофуранового ряда в биологических жидкостях нами была предпринята попытка определения производных нитрофуранового ряда (фуразолидон, фурадонин, фурагин) в моче. Выбор данной биологической жидкости обуславливался тем, что рас-

Таблица 3
Сопоставление ингибирующих свойств фуразолидона, фурадонина и петелила

Препарат	Процент ингибирования*	
	$C, 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л	$C, 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л
Фуразолидон	$44,55 \pm 0,4$	$34,72 \pm 0,3$
Фурадонин	$25,43 \pm 0,3$	$19,66 \pm 0,3$
Петелил	$92,78 \pm 0,3$	$71,79 \pm 0,3$

* % ингибирования равен $((I_0 - I_1)/I_0) \cdot 100$ %, где I_1 — ток окисления пероксида водорода в присутствии ингибитора, I_0 — ток окисления пероксида водорода в отсутствие ингибитора.

смаатриваемые лекарства выводятся из организма человека именно с мочой. Согласно литературным данным, в состав мочи входит целый ряд компонентов: адреналин, глюкоза, железо, калий, кальций, креатин, креатинин, магний, медь, мочевая кислота, мочевины, оксалаты [17]. Была сделана попытка оценить влияние некоторых составляющих мочи на биочувствительную часть моноаминоксидазного биосенсора. Установлено, что большинство компонентов мочи (глюкоза, соединения Fe(III), K(I), Ca(II), Mg(II), Cu(II), мочевины) не окисляются в рассматриваемой области потенциалов (от 0 до 1,0 В) в условиях эксперимента. В то же время такие компоненты, как цистеин и $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, окисляются в области потенциалов 0,3 – 0,45 В. Однако поскольку аналитический сигнал измеряли при потенциале 0,8 В, то эти соединения не оказывали мешающего действия. Предварительными исследованиями установлено, что величина тока при рабочем потенциале 0,8 В в присутствии образца мочи превышает в 3 раза уровень фонового сигнала. Это может быть связано с наличием в моче компонентов, окисляющихся при потенциалах менее положительных, чем 0,8 В, в частности с содержанием норадrenalина и адреналина, которые могут вести себя электрохимически подобно дофамину. Также нельзя исключить и влияние мочевой кислоты, которая окисляется в более положительной области потенциалов.

Разбавление мочи снижает влияние матричных компонентов, поэтому использовали общепринятый прием — разбавляли аликвоту мочи в 100, 50, 20, 10 раз.

Таблица 4
Результаты определения фуразолидона, фурадонина и фурагина в фармпрепаратах “Фуразолидон” и “Фурадонин”, “Фурагин” с помощью моноаминоксидазного биосенсора ($n = 5, P = 0,95$)

Фармпрепарат (таблетки)	Содержание по прописи, моль/л	Найдено, моль/л	S_r
Фуразолидон РУП “Борисовский завод медицинских препаратов” (Беларусь)	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$(2,4 + 0,4) \cdot 10^{-3}$	0,16
Фурадонин (АО “Олайнфарм”, Латвия)	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$(3,8 + 0,5) \cdot 10^{-3}$	0,13
Фурагин (ЗАО “Оболонское”)	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$(1,7 + 0,3) \cdot 10^{-3}$	0,17

Таблица 5

Определение в моче фуразолидона с помощью моноаминоксидного биосенсора ($n = 5$, $P = 0,95$)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r
$5 \cdot 10^{-5}$	$(4,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	0,043
$6 \cdot 10^{-5}$	$(5,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	0,080
$7 \cdot 10^{-5}$	$(6,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	0,030

Было установлено, что величина фонового тока соизмерима с величиной тока в отсутствие определяемых компонентов при разбавлении мочи в 50 раз. Поэтому модельные растворы определяемых лекарственных препаратов готовили, используя именно такие растворы мочи.

Методика определения производных нитрофуранового ряда в образцах мочи

Для определения фуразолидона, фурадонина, фурагина с помощью моноаминоксидного биосенсора использовали разбавленные в 50 раз растворы мочи. Для этого в ячейку с моноаминоксидным биосенсором на 120 мкл вносили 104,3 мкл ацетатного буфера, 1,2–12 мкл раствора мочи и раствор инкубировали 10 мин. Затем добавляли 3,7 мкл субстрата (дофамин) с концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ М и измеряли значение тока при потенциале +0,8 В. Методом “введено — найдено” (табл. 5) установлено, что определение производных нитрофуранового ряда на примере фуразолидона в образцах мочи возможно с использованием градуировочного графика $I = (0,91 \pm 0,03) + (- (0,120 \pm 0,006))(-\lg C)$, $r = 0,99838$, S_r составляет не более 0,09.

Таким образом, в работе показана возможность оценки содержания соединений нитрофуранового ряда по их ингибирующему действию на иммобилизо-

ванную MAO как в соответствующих лекарственных препаратах, так и в биологических жидкостях на примере мочи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 08-03-00749а).

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Т. 2, Новая Волна, Москва (2002), сс. 302 – 304.
2. А. В. Андрущенко, *Совр. психиатрия*, 1(2), 44 – 46 (1998).
3. C. Bock, C. Stachel, and P. Gowik, *Anal. Chim. Acta*, **586**, 348 – 358 (2007).
4. A. Conneely, A. Nugent, O. M. Keeffe, et al., *Anal. Chim. Acta*, **483**(1 – 2), 91 – 98 (2003).
5. J. Barbosa, S. Moura, R. Barbosa, et al., *Anal. Chim. Acta*, **586**(1 – 2), 359 – 365 (2007).
6. A. Leitner, P. Zollner, and W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **939**(1 – 2), 49 – 58 (2001).
7. L. Rodziewicz, *J. Chromatogr. B*, **864**(1 – 2), 156 – 160 (2008).
8. A. A. J. Torriero, E. Salinas, E. J. Marchevsky, et al., *Anal. Chim. Acta*, **580**(2), 136 – 142 (2006).
9. A. Guerrieri, T. R. I. Cataldi, and R. Ciriello, *Sensors and Actuators B*, **126**(2), 424 – 430 (2007).
10. C. Bertucci, S. Cimitan, and L. Menotti, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**(4 – 5), 697 – 706 (2003).
11. A. Yu. Budantsev, *Anal. Chim. Acta*, **249**(1), 71 – 76 (1991).
12. Е. Б. Никольская, О. В. Ягодина, Р. Р. Искандеров, *Журн. аналит. химии*, **50**(12), 1275 – 1279 (1995).
13. S. de Jesus Djane, M. C. M. Couto Cristina, and N. Araujo Alberto, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, 983 – 990 (2003).
14. Э. П. Медянцева, Р. М. Варламова, Д. А. Гималетдинова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **41**(6), 53 – 56 (2007).
15. Э. П. Медянцева, Р. М. Варламова, Д. А. Гималетдинова и др., *Журн. аналит. химии*, **63**(3), 302 – 307 (2008).
16. P. Skladal, M. Fiala, and J. Krejci, *J. Environ. Anal. Chem.*, **65**, 139 – 148 (1996).

Поступила 14.05.09

AMPEROMETRIC DETERMINATION OF NITROFURAN DERIVATIVES USING A BIOSENSOR BASED ON IMMOBILIZED MONOAMINE OXIDASE

D. A. Volotskaya, E. P. Medyantseva*, E. R. Valieva, R. M. Varlamova, A. N. Fattakhova, and G. K. Budnikov

Department of Analytical Chemistry and Biochemistry, Kazan State University, Kazan, Tatarstan, Russia

e-mail: Elvina. Medyantseva@ksu.ru

A new method has been developed for determining nitrofuran derivatives (furazolidon, furadonin and furagin) in tablets and in urine, using an amperometric biosensor based on immobilized monoamine oxidase (MAO) and a printed platinum electrode. It is established that nitrofuran derivatives influence the catalytic activity of MAO like the classical tricyclic antidepressants (TCAs), but this effect is weaker than that of TCAs. The limits of detection for furazolidon, furadonin and furagin are $8.3 \cdot 10^{-9}$, $8.5 \cdot 10^{-8}$, and $9.4 \cdot 10^{-10}$ mol/liter, respectively. The results show that the side effect of furazolidon, furadonin, furagin on the MAO activity must be taken into account by patients administering and doctors prescribing these drugs.

Key words: Amperometric biosensor, monoamine oxidase (MAO), nitrofuran derivatives, printed platinum electrode