

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2008

Е. С. Дергунова¹, О. В. Воронежцева¹, С. А. Еремин², Т. Н. Ермолаева¹

ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ 4-АМИНОФЕНОЛА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ С ПОМОЩЬЮ ПЬЕЗОКВАРЦЕВЫХ ИММУНОСЕНСОРОВ

¹ Липецкий государственный технический университет;

² Московский государственный университет

Разработан проточный пьезокварцевый иммуносенсор для экспрессного определения 4-аминофенола в фармацевтических препаратах на основе парацетамола. В качестве биорецепторного покрытия сенсора использован 4-аминофенол-белковый конъюгат (4-AP-GA-BSA), иммобилизованный на предварительно силанизированной поверхности серебряного электрода. Изучено влияние концентрации поликлональных антител на величину аналитического сигнала сенсора: оценена активность иммунореагентов по значениям констант связывания $K_{св}$. Разработана методика проточно-инжекционного определения 4-аминофенола в фармацевтических препаратах с применением пьезокварцевого иммуносенсора в качестве детектора. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций 2 – 120 нг/мл, предел обнаружения 4-аминофенола составляет 1,1 нг/мл.

Парацетомол входит в ряд комбинированных препаратов (колдрекс, панадеин, солпадеин и др.) и выпускается в форме таблеток, микстур, сиропов, порошков [1]. Практически всегда парацетамол содержит следовые количества 4-аминофенола — соединения, используемого при его получении [1, 2]. Кроме того, при нарушении условий и истечении сроков хранения количественное содержание 4-аминофенола возрастает, и препарат приобретает нежелательные свойства и вызывает побочные эффекты, а при больших концентрациях последнего может привести к пирогенному шоку и смерти.

Согласно требованиям Государственной фармакопеи (XI изд.) содержание 4-аминофенола в парацетамоле должно превышать 0,01 % [3]; предельные нормы содержания 4-аминофенола в парацетамоле для ряда стран (Великобритания, Япония, США) существенно ниже (0,005 % и ниже) [4].

В настоящее время для определения 4-аминофенола рекомендуется титриметрический метод [3], характеризующийся невысокой чувствительностью и не позволяющий обнаруживать концентрации 4-аминофенола ниже 0,01 %. Известные инструментальные методы анализа, такие как спектрофотометрия [5], ВЭЖХ [6], термолинзовая спектроскопия [7], требуют дополнительной подготовки и, как правило, длительны и трудоемки.

Альтернативой дорогостоящим и многостадийным методам анализа служат способы, основанные на использовании иммуносенсоров, аналитический сигнал которых регистрируется при протекании иммунохимических реакций [8].

В последнее время наблюдается повышенный интерес к пьезокварцевым сенсорам, на поверхности кото-

рых иммобилизованы иммунореагенты. Пьезокварцевые иммуносенсоры характеризуются экспрессивностью, простотой выполнения измерений, возможностью применения в качестве детекторов в проточно-инжекционном анализе. С их помощью можно определять концентрации низкомолекулярных соединений на уровне нг/мл и ниже без введения дополнительных меток. В отличие от широко распространенного твердофазного иммуноанализа [9], иммуносенсоры легко регенерируются и могут использоваться многократно, что снижает стоимость анализа [10]. Аналитическим сигналом служит изменение частоты колебаний пьезокварцевого сенсора (Δf) при увеличении массы биорецепторного покрытия за счет образования на его поверхности иммунного комплекса, а проведение измерений в проточном режиме позволяет автоматизировать анализ и осуществлять в одном цикле измерения как регистрацию аналитического сигнала сенсора, так и регенерацию биорецепторного слоя.

Цель исследования — разработка способа проточно-инжекционного анализа с применением пьезокварцевого иммуносенсора для определения содержания 4-аминофенола в фармацевтических препаратах.

Экспериментальная часть

Реактивы: γ -аминопропилтриэтоксисилан (“Sigma”, USA); глутаровый альдегид (“Reanal”, Венгрия); 4-аминофенол, дигидрофосфат, гидрофосфат, хлорид, роданид калия, хлорид натрия, соляная кислота, ацетон (“х.ч.”, отечественного производства); поликлональные антитела к 4-аминофенолу (Lot Myg-3 и Myg-2), полученные при иммунизации кроликов на антиген — 4-аминофенол, сконъюгированный с бычьим сывороточ-

ным альбумином (BSA) через глутаровый альдегид (GA); 4-аминофенол-белковый конъюгат 4-AP-GA-BSA.

В работе использовали буферный раствор следующего состава (фосфатный буферный физиологический раствор pH 7,2): NaCl (8,0145 г); KCl (0,2012 г); NaH₂PO₄ · 12H₂O (2,864 г); KH₂PO₄ (0,204 г) в 1 л дистиллированной воды.

Оборудование. Установка для проточно-инжекционного анализа (рис. 1) включает: – дозатор, проточную ячейку объемом 15 – 20 мкл, обеспечивающую контакт с анализируемой пробой только одной стороны сенсора, блок питания, перистальтический насос (“Microtechna”, Чехия), схему возбуждения (TTL на базе IC74LS320), трансформирующую изменение массы биорецепторного покрытия, вследствие образования гетерогенного иммунокомплекса на поверхности электрода, частотомер ЧЗ – 54 (“Эталон”, Россия) и персональный компьютер.

В качестве сенсоров использовались пьезокварцевые резонаторы отечественного производства АТ — среза с серебряными электродами, диаметром 5 мм и собственной частотой 10 МГц ± 1 Гц (“Этна”, Россия).

Процедура иммобилизации иммунореагентов для определения 4-аминофенола.

Перед иммобилизацией электроды резонатора тщательно обезжировали ацетоном и высушивали в потоке теплого сухого воздуха. Для формирования силосановой подложки точечным методом на поверхность серебряного электрода при помощи микрошприца наносили 1 мкл 5 % раствора γ-аминопропилтриэтоксисилана (γ-APTS) в ацетоне, после сенсор выдерживали при 100 °С в сушильном шкафу в течение 30 мин для активации поверхности. Затем наносили 15 – 20 мкл 2,5 % глутарового альдегида и выдерживали на воздухе в течение 30 мин. Промывали буферным раствором (pH 7,2) и наносили 15 мкл 0,05 %, раствора 4-аминофенол-белкового конъюгата 4-AP-GA-BSA. Иммобилизованный сенсор помещали на 24 ч влажную камеру при температуре 4 °С. После предварительного промывания в буферном растворе в течение 30 мин, пьезокварцевый иммуносенсор помещали в проточно-инжекционную ячейку детектирования.

Регенерация сенсора. Иммуносенсор может быть использован многократно после регенерации биослоя веществами, способными разрушать иммунный комплекс на его поверхности (HCOOH, NaOH, (CH₃)₂CO и KCNS). При применении в качестве регенерирующего 0,05 mM раствора KCNS достаточно быстро разрушается иммунный комплекс и сохраняется постоянная масса подложки. Чувствительность сенсора не изменялась в течение 15 – 20 измерений.

Результаты и их обсуждение

В основе работы пьезокварцевых иммуносенсоров лежит обратимая иммунохимическая реакция $A + B \rightleftharpoons AB$ (где А — антитела к 4-аминофенолу, В — 4-аминофенол, сконъюгированный с белком, АВ — поверхностный иммунный комплекс) и аналитический сигнал регистрируется при увеличении массы покры-

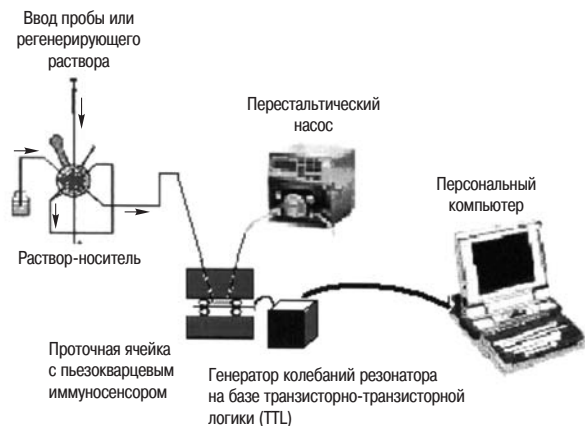


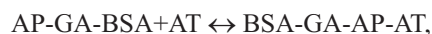
Рис. 1. Установка для проточно-инжекционного анализа

тия вследствие образования на поверхности сенсора иммунного комплекса. Известно, что определение низкомолекулярных соединений по прямому механизму затруднено, поэтому применяли конкурентный формат анализа [9, 11]. На поверхности электродов сенсора закрепляли 4-аминофенол-белковый конъюгат. В пробу для определения 4-аминофенола вводили фиксированное количество антител, концентрацию которых устанавливали заранее, и выдерживали в течение 2 – 3 мин до завершения образования гомогенного иммунного комплекса определяемого соединения с соответствующими антителами. Затем пробу вводили в поток раствора-носителя и измеряли аналитический сигнал сенсора при взаимодействии несвязавшихся антител пробы с гаптен-белковым конъюгатом, закрепленным на поверхности электродов.

Таким образом, для разработки способа определения 4-аминофенола необходимо:

- 1) выбрать комплементарную пару иммунореагентов, обеспечивающую высокую прочность связывания, которую можно оценить по константе аффинности;
- 2) определить оптимальную концентрацию антител, вводимых в анализируемую пробу, соответствующую 50 % ингибированию активных центров биорецепторного покрытия пьезокварцевого иммуносенсора.

Оценка аффинности иммунореагентов. Для установления активности иммунореагентов проведены кинетические исследования взаимодействия антител (АТ) с 4-аминофенол-белковым конъюгатом (4-AP-GA-BSA), иммобилизованным на поверхности электрода. Кинетическое уравнение обратимой гетерогенной иммунохимической реакции:



может быть представлено в следующем виде с учетом пропорциональности сигнала сенсора концентрации образовавшегося иммунного комплекса (BSA-GA-AM-AT):

$$-df/dt = (k_0 \cdot C + k_p) f - k_0 f_m C, \quad (1)$$

где C — концентрация антител в растворе; f_m и f — частота сенсора перед началом и в ходе измерений, k_0 , k_p — константы скорости образования и разрушения иммунного комплекса, соответственно. Используя мето-

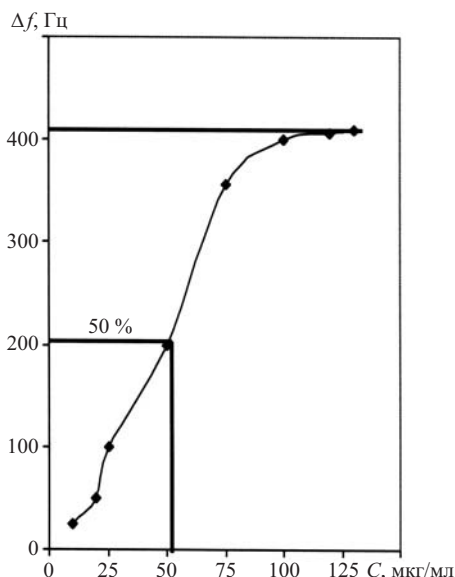


Рис. 2. Выбор оптимальной концентрации поликлональных антител к 4-аминофенолу

дику Скетчарда, модифицированную для пьезокварцевых иммуносенсоров [12], были рассчитаны константы скорости прямой и обратной реакции. Константу связывания антител с гаптен-белковым конъюгатом ($K_{св}$) определяли как отношение k_o/k_p (табл. 1).

С учетом обратимого характера иммунохимической реакции было рассчитано максимальное значение аналитического сигнала, которое может быть достигнуто при проведении реакции в равновесных условиях [12].

$$\Delta f_p = f_m - \frac{k_o c f_m}{k_o c + k_p} \quad (2)$$

Так как при проведении измерений в потоке равновесие не достигается, то рассчитанные максимальные значения аналитического сигнала Δf_p могут быть полезны для оценки степени протекания иммунохимической реакции и установления оптимальных режимов проточно-инжекционного анализа.

Значения $K_{св}$ зависят от природы антител, активности и степени их очистки. Обычно в иммунном анализе применяются антитела с константой связывания не ниже чем 10^8 моль⁻¹·л. Как видно из табл. 1, максималь-

Таблица 1

Определение констант связывания гаптен-белкового конъюгата с антителами Mуг-2 и Mуг-3

Антитела	$k_o \cdot 10^{-4}$ (моль ⁻¹ · л · с ⁻¹)	$k_p \cdot 10^5$ (с ⁻¹)	$K_{св} \cdot 10^{-8}$ (моль ⁻¹ · л)	Δf_p , кГц
Mуг-2 19.06.00	5,8	1,6	3,6	225
Mуг-2 19.07.00	46	2,5	18	45
Mуг-2 23.10.10	2,2	3,9	0,6	128
Mуг-2 02.11.00	20	1,5	13	62
Mуг-3 19.06.00	5,4	4,6	11,7	29
Mуг-3 09.07.00	1,7	4,6	3,6	93
Mуг-3 22.08.00	5,0	0,2	257	1,3
Mуг-3 23.10.00	3,0	4,7	6,3	53
Mуг-3 02.11.00	0,2	1,6	1,5	229

ную активность проявляют поликлональные антитела Mуг-3 (22.08.00) с $K_{св} = 25,7 \cdot 10^9$ моль⁻¹·л, что превышает аналогичные значения для других антител той же серии в 20–60 раз. Напротив, антитела серии Mуг-2 характеризуются относительно невысокой константой связывания ($K_{св} = 0,6 - 18 \cdot 10^8$ моль⁻¹·л). Таким образом, для дальнейшего исследования была выбрана сыворотка Mуг-3 (22.08.00).

Определение рабочей концентрации антител для определения 4-аминофенола

Рабочую концентрацию специфических антител устанавливали с помощью графической зависимости величины аналитического сигнала сенсора от их концентрации на линейном участке (рис. 2). Концентрация, соответствующая 50% связыванию, для антител Mуг-3 (22.08.00) составляет 50 мкг/мл. Использование концентраций антител, выходящих за пределы линейной зависимости, приводит к искажению сигнала сенсора из-за неспецифического связывания в области малых концентраций и нарушения линейной зависимости Δf от изменения массы биорецепторного покрытия в области больших концентраций. Применение в конкурентном режиме концентрации антител, соответствующей половине линейного интервала графика, позволяет достичь стехиометрического соотношения числа активных центров на поверхности иммуносенсора и количества молекул, несвязавшихся на этапе проведения гомогенной иммунохимической реакции.

Проточно-инжекционное определение 4-аминофенола в фармацевтических препаратах. Разработана методика определения 4-аминофенола в фармацевтических формах. Перед началом измерений через систему пропускали буферный раствор до стабилизации сигнала сенсора.

Измерительный цикл включал следующие этапы:

(1) пропускание через ячейку фосфатного буферного раствора (1 мл) до и после измерения;

(2) введение в поток анализируемой пробы (0,2 мл), что вызывает резкое снижение частоты колебаний сенсора вследствие взаимодействия определяемого соединения с рецепторным покрытием;

(3) пропускание буферного раствора (0,2 мл) для удаления избыточных, не связавшихся в иммунный комплекс, молекул аналита;

(4) ввод регенерирующего раствора (0,1 мл) для диссоциации иммунного комплекса, образованного на поверхности электродов сенсора и восстановление частоты колебаний сенсора практически до исходных значений.

Таблица 2

Проверка правильности определения 4-аминофенола с помощью пьезокварцевого иммуносенсора ($n = 3, P = 0,95$)

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	S_r
5,0	5,2 ± 0,1	0,01
50,0	50,1 ± 0,1	0,01
100,0	100,4 ± 0,2	0,02

Таблица 3
Определение 4-аминофенола в фармацевтических препаратах, содержащих парацетамол ($n = 3, P = 0,95$)

Фармацевтический препарат	Концентрация 4-аминофенола в анализируемом растворе, нг/мл	Содержание 4-аминофенола в лекарственной форме, %	S_r
"Парацетомол":			
ЗАО "Еврофарм", Барнаул	66,1 ± 0,1	0,007	0,01
ОАО "Татхимфармпрепараты", Казань	5,1 ± 0,1	0,0005	0,02
ОАО "Биохимик", Саранск	5,4 ± 0,1	0,0005	0,01
ЗАО "Медисорб", Пермь	10,6 ± 0,1	0,001	0,02
ОАО "Уралбиофарм", Екатеринбург	3,8 ± 0,1	0,0004	0,01
ОАО "Фармстандарт", Курск	3,5 ± 0,1	0,0003	0,01
"Coldrex HotRem", Глашко-SmithKline, Испания	18,6 ± 0,1	0,002	0,01
"Парацетомол-Н.С.", ОАО "Щелковский витаминный завод"	2,8 ± 0,1	0,0003	0,02
"Аскофен-П" ОАО "Фармстандарт", Курск	20,1 ± 0,1	0,002	0,02
"Цитрамон-П" ЗАО "Медисорб", Пермь	26,5 ± 0,1	0,003	0,02

Определение 4-аминофенола осуществляли методом градуировочного графика и методом добавок. Для построения градуировочной функции использовали стандартные растворы 4-аминофенола, содержащие 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 120, 150 нг/мл определяемого компонента в буферном растворе. К 950 мкл раствора 4-аминофенола добавляли фиксированный объем (50 мкл) специфических антител с концентрацией 50 мкг/мл. Смесь инкубировали 2 – 3 мин при 20 °С до завершения реакции между антителами и 4-аминофенолом в растворе и вводили в поток раствора-носителя. Градуировочная функция описывается уравнением $y = -1,6x + 203$ ($R = 0,99$). Для устранения влияния матричных компонентов на определение 4-аминофенола при анализе многокомпонентных смесей применяли метод добавок.

Правильность определения 4-аминофенола разработанным способом проверена методом "введено-найденно" (табл. 2). Способ применим в достаточно широком диапазоне определяемых концентраций (2 – 120 нг/мл).

FLOW-INJECTION DETERMINATION OF 4-AMINOPHENOL IN PHARMACEUTICALS USING PIEZOQUARTZ IMMUNOSENSORS

E. S. Dergunova¹, O. V. Voronezhstseva¹, S. A. Eremin², and T. N. Ermolaeva¹

¹ Lipetsk State Technical University, Lipetsk, Russia;

² Moscow State University, Moscow, Russia

A flow-injection piezoelectric immunosensor for rapid detection of 4-aminophenol in paracetamol-based pharmaceutical preparations has been developed. The silver electrodes of the piezosensor are modified with 4-aminophenol – protein conjugate (4-AP-GA-BSA), which is covalently attached via glutaric aldehyde after activation of the electrode surface with g-aminopropyltriethoxysilane. The influence of the concentration of polyclonal antibodies on the analytical signal of a sensor has been investigated and the activity of immunoreagents is evaluated using binding constants. A procedure of the flow injection detection of 4-aminophenol in pharmaceuticals using the proposed piezoelectric immunosensor as the detector is developed. The calibration curve is linear in a range of concentrations within 2 – 120 ng/ml, and a detection limit of 4-aminophenol is 1.1 ng/ml.

Проанализированы фармацевтические препараты российских и зарубежных производителей, содержащие парацетамол (табл. 3). Во всех анализируемых формах не зарегистрировано превышение нормативов содержания 4-аминофенола, установленных Государственной фармакопеей (XI изд.). Однако содержание примеси в препарате, выпущенном ЗАО "Еврофарм", превышает требования Британской фармакопеи.

Разработанный способ проточно-инжекционного определения 4-аминофенола с помощью пьезокварцевых иммуносенсоров характеризуется экспрессностью (время единичного определения — 3 мин), высокой чувствительностью (предел обнаружения 1,1 нг/мл), воспроизводимостью (S_r не более 0,02) и правильностью, не требует сложной предварительной пробоподготовки и разделения многокомпонентных препаратов. Он может быть рекомендован для рутинных анализов фармацевтических препаратов на основе парацетамола.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Липецкой области (грант № 06-03-96339 р центр а).

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Т. 1 Изд. 13, Торсинг, Харьков (1998), сс. 162 – 164.
2. А. П. Арзамасцев (ред.), *Фармацевтическая химия*, Учеб. пособие, изд. 2, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2005), сс. 262 – 265.
3. *Государственная фармакопея СССР*, XI изд., Вып. 1 и 2, Медицина, Москва (1987).
4. *Британская фармакопея*, V. 1. L., (1996).
5. K. D. Khalaf, B. A. Hasan, A. Morales-Rubio, and M. De La Guardia, *Talanta*, **41**, 547 – 555 (1994).
6. A. Brega, P. Prandini, C. Amaglio, and E. Pafumi, *J. Chromatogr.*, **535**, 311 – 316 (1990).
7. М. А. Проскурин, Н. В. Орлова, А. В. Пихтарь и др., *Вестн. моск. университета*, **42**(1), 30 – 32 (2001).
8. С. К. O'Sullivan and G. G. Guilbault, *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, 663 – 670 (1999).
9. M. Fránek, J. Zeravik, S. A. Eremin, et al., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **371**, 456 – 466 (2001).
10. Е. Н. Калмыкова, Т. Н. Ермолаева, С. А. Еремин, *Вестн. моск. университета*, **43**, 391 – 401 (2002).
11. Э. П. Медянцева, Е. В. Халдеева, Г. К. Будников, *Журн. аналит. химии*, **56**(10), 1015 – 1031 (2001).
12. Е. Н. Калмыкова, Е. В. Мелихова, Е. С. Дергунова и др., *Сорбц. и хромат. процессы*, **4**(6), 598 – 615 (2004).

Поступила 11.05.06