

УДК 543.645.9

## ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕПАРИНА В КОМПЛЕКСЕ С КРАСИТЕЛЕМ МЕТИЛЕНОВЫМ ГОЛУБЫМ

Вишенкова Д.А., Короткова Е.И., Дорожко Е.В.

ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»,  
Томск, e-mail: vishenkova\_darya@mail.ru

В данной работе в основу определения гепарина на стекло-углеродном электроде (СУЭ) методом вольтамперометрии с постоянно-токовой разверткой потенциала легла его комплексообразующая способность, реализующаяся путем взаимодействия анионных группировок полисахарида с катионными группами других соединений. В качестве соединения, способного образовать комплекс с гепарином, использовался краситель катионной природы метиленовый голубой (МГ). В фосфатном буферном растворе эквимолярной смеси  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  с pH 6,86 МГ дает хорошо выраженный пик электроокисления при  $E = -0,02$  В (нас. х. с.э.). После добавления гепарина к раствору МГ ток пика окисления красителя значительно уменьшался со смещением потенциала в положительную область без появления новых пиков в диапазоне сканирования. Подобраны оптимальные условия для электрохимического определения гепарина в лекарственной форме с использованием МГ. При оптимальных условиях уменьшение тока пика окисления МГ пропорционально концентрации гепарина в диапазоне от  $3,85 \cdot 10^{-4}$  до  $3,85 \cdot 10^{-3}$  мг/мл.

**Ключевые слова:** вольтамперометрия, гепарин, метиленовый голубой, электроокисление, антикоагулянт

## VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF HEPARIN IN THE COMPLEX WITH METHYLENE BLUE DYE

Vishenkova D.A., Korotkova E.I., Dorozhko E.V.

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, e-mail: vishenkova\_darya@mail.ru

In this paper, the basis for the determination of heparin by constant-current potential sweep voltammetry on the glass-carbon electrode (GCE) was its complexing ability, which is realized by the interaction of the anionic groups of the polysaccharide with cationic groups of other compounds. As the compound which is capable to form a complex with heparin, dye of the cationic nature methylene blue (MB) was used. In the phosphate buffer solution of an equimolar mixture  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  with pH 6,86 MB had a well-defined peak of electrooxidation at  $E = -0,02$  V (vs. CSE). After the addition of heparin into the MB solution the oxidation peak current decreased greatly with the positive movement of the peak potential without appearance of new peaks in the scanning potential range. Optimum conditions for the electrochemical determination of heparin in dosage form with using MB were picked up. Under optimal conditions the decrease of oxidation peak currents of MB was proportional to heparin concentration in the range of  $3,85 \cdot 10^{-4}$  to  $3,85 \cdot 10^{-3}$  mg/ml.

**Keywords:** voltametry, heparin, methylene blue, electrooxidation, anticoagulant

Гепарин – кислый серосодержащий гликозаминогликан, биополимер, состоящий из полисахаридных цепей, связанных с общим белковым ядром. Он является антикоагулянтным и антитромбическим средством, применяемым уже более 60 лет в клинической практике, в частности, при операциях на сердце и кровеносных сосудах, для поддержания жидкого состояния крови в аппаратах гемодиализа и искусственного кровообращения, при профилактике и терапии тромбозомболических заболеваний [14].

Лабораторный контроль гепаринотерапии необходим для минимизации риска развития кровотечений при передозировке и оптимизации антитромбического лечения. Правильность определения активности гепарина крайне важна для производителей лекарственных форм данного соединения. Результаты измерений активности гепарина в субстанциях, полупродуктах и целевых лекарственных средствах позволяют обеспечить эффективность производства и в дальнейшем дают возможность предлагать клинике точно аттестованные препараты [13].

Благодаря широкому спектру применения гепарина его мониторинг в различных объектах вызывает большой интерес для многих медиков, биологов и химиков.

Анализ гепарина является сложной задачей из-за неоднородности соединения, размера молекулы и распределения в ней заряда дисперсии.

Существует ряд методов определения гепарина в разных объектах искусственного и природного происхождения. В настоящее время можно выделить биологические [2, 4, 10] и химические методы анализа. Химические же в свою очередь включают в себя три основные группы: спектральные [6, 8–9], хроматографические [1, 3, 7] и электрохимические [11–12].

Данная работа посвящена определению гепарина в лекарственной форме с использованием красителя МГ методом вольтамперометрии.

### Материалы и методы исследования

Исходным препаратом в исследованиях использовали фармакологический раствор высокомолекулярного гепарина натрия в форме тетранатриевой

соли ( $\text{Na}_4\text{Hep}$ ), для внутреннего и подкожного введения (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия, город Москва), упакованный во флаконы по 5 мл. Каждый миллилитр такого раствора содержал 38,5 мг соли. Раствор красителя МГ с классификацией ч.д.а. готовили растворением его навески 0,3198 г. в 100 мл бидистиллированной воды. Фоновым электролитом выбран фосфатный буферный раствор (эквимольная смесь  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ) с рН 6,86.

Все исследования выполняли на вольтамперометрическом анализаторе ТА-2 (ООО «Томьаналит», Россия, город Томск) с трехэлектродной системой, включающей индикаторный СУЭ, хлорид серебряный электрод сравнения и вспомогательный электрод из платины.

Исследуемый раствор фонового электролита объемом 10 см<sup>3</sup> помещали в электрохимическую ячейку, добавляли лекарственную форму гепарина и краситель МГ в соотношении 1:10. Исследования проводили при постоянно-токовой развертке со скоростью 40 мВ/с в анодной области потенциалов от -1,0 до 1,5 В, время перемешивания раствора составляло 50 с, успокоения 60 с. Съемку анодной вольтамперограммы повторяли не менее пяти раз.

Для уменьшения ошибки эксперимента используемый в работе индикаторный СУЭ проходил предварительную поляризацию в области потенциалов от 2 до -2 В методом циклической вольтамперометрии.

### Результаты исследования и их обсуждение

В литературных источниках информации о прямом электрохимическом определении гепарина при разных условиях ранее не сообщалось. Кроме того, в работе при поиске аналитического сигнала от гепарина в чистом виде на разных материалах электрода (РПЭ, СУЭ, РтЭ) получено не было. В связи с этим был предложен способ косвенного определения гепарина в комплексе с представителем соединений класса азокрасителей МГ. В исследовании использован нетоксичный и более чувствительный СУЭ, при проведении эксперимента на котором получены более воспроизводимые результаты по определению гепарина в лекарственной форме в комплексе с МГ.

Предварительно исследовались электрохимические свойства МГ методами циклической, катодной и анодной вольтамперометрии. Наиболее воспроизводимый сигнал МГ был получен в анодной области в диапазоне потенциалов от -1,0 до 1,5 В, в катодной области имело место мешающее влияние кислорода на МГ, поэтому область от -1,0 до 1,5 В была выбрана как рабочая. Большой интерес представляло собой исследование по выявлению влияния рН на ток окисления МГ. На рис. 1 представлена зависимость тока окисления МГ от рН фонового электролита на СУЭ.

Из рис. 1 видно, что в нейтральных и щелочных средах ток достигает своего

максимума в отличие от кислых. В дальнейших исследованиях рН = 6,86 было выбрано как оптимальное значение.

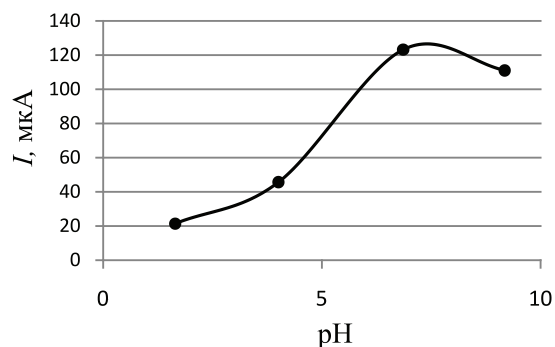


Рис. 1. Зависимость тока электроокисления МГ на СУЭ от рН фонового электролита

При выборе оптимальных условий для определения гепарина в комплексе с МГ были сняты анодные вольтамперограммы МГ в отсутствии и присутствии гепарина, которые представлены на рис. 2.

В таблице представлены данные изменения интенсивности пиков окисления, потенциалов комплекса МГ-Нер в зависимости от концентрации гепарина в системе.

Используя данные, представленные в таблице, была построена зависимость тока окисления комплекса МГ-Нер от концентрации гепарина в электрохимической ячейке (рис. 3).

Из графика, представленного на рис. 3, видно, что с увеличением концентрации гепарина в ячейке уменьшается интенсивность сигнала окисления метиленового голубого в прямолинейной области концентраций от  $10^{-4}$  до  $10^{-3}$  мг/мл, что может быть использовано для определения гепарина косвенным методом в лекарственной форме.

### Выводы

Подобраны оптимальные условия для определения гепарина в лекарственной форме косвенным методом по уменьшению пика окисления метиленового голубого.

При оптимизированных условиях получена линейная зависимость в диапазоне концентраций гепарина от  $3,85 \cdot 10^{-4}$  до  $3,85 \cdot 10^{-3}$  мг/мл.

### Заключение

В фосфатном буферном растворе с рН 6,86 МГ заряжен положительно, а гепарин – отрицательно, взаимодействуя друг с другом электростатически, они образуют комплекс, в результате концентрация свободного МГ в растворе уменьшается, что приводит к снижению тока окисления МГ.

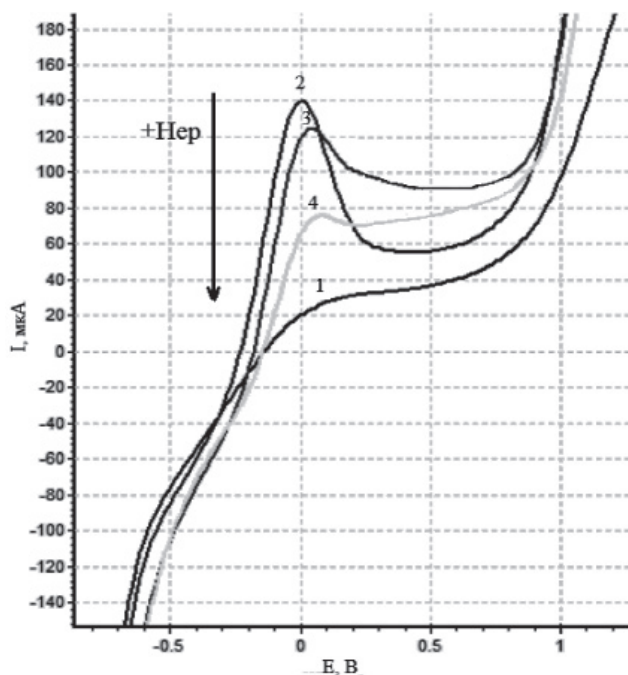


Рис. 2. Вольтамперограмма окисления МГ в отсутствии и присутствии гепарина на СУЭ:  
1 – фоновая кривая; 2 – МГ  $10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup>; 3 –  $3,85 \cdot 10^{-4}$  мг/мл Heparin;  
4 –  $19,25 \cdot 10^{-4}$  мг/мл Heparin.  $W = 40$  мВ/с, pH = 6,86

Данные анодной вольтамперометрии окисления комплекса МГ-Геп

С (МГ), моль/дм <sup>3</sup>	$E_{MG}$ , В	С(Heparin) $\cdot 10^{-4}$ , мг/мл	$\Delta i$ , мкА	$E_{Hep}$ , В
$10^{-4}$	-0,02	19,25	1,446651	0,01
		38,5	1,436584	
		192,5	1,34398	
		385	1,158701	

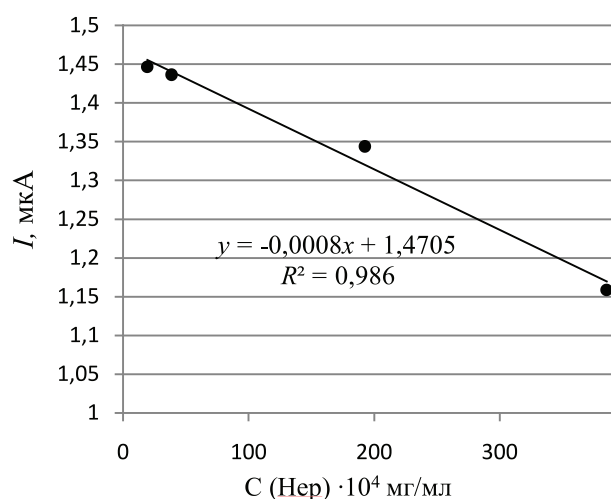


Рис. 3. График зависимости токов окисления комплекса МГ-Геп от концентрации гепарина в электрохимической ячейке

Полученные в ходе исследования данные по уменьшению сигнала комплекса МГ при  $E = -0,02$  В с увеличением концентрации гепарина в системе могут быть использованы для разработки косвенного метода

определения гепарина в лекарственных препаратах.

Работа выполнена в рамках государственного задания «Наука» по теме 3.2702.2011.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-7366.2013.8.*

### Список литературы

1. Determination of over sulfated chondroitin sulfate and derma tan sulfate in heparin sodium using anion-exchange chromatography with UV detection. Dionex Application Note 235. www.dionex.com. – 2010.

2. Ghous T. Flow Injection Determination of Heparin by Inhibition of Ribonuclease (Rnase). // Jour. Chem. Soc. Pak. – 2004. – Vol. 26, № 1. – P. 28–34.

3. Heparin Sodium, USA Pharmacopeia Forum. – 2009. – P. 1–4.

4. Jaques L.B. A method for the determination of heparin in blood / L.B. Jaques, F.C. Monkhouse, M. Stewart // J. Physiol. – 1949. – Vol. 109. – P. 41–48.

5. Jan Langmaier, Jiri Olsak, Eva Samcova, Zdenek Samec, Antonin Trojanek // Electroanalysis. – 2006. – Vol. 18, № 2. – P. 115–120.

6. Khokhlov. V.Yu., Selemenev V.F., Khohlova O.N., Shcherbinin R.L // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 1999. – Vol. 33, № 8. – P. 450–451.

7. Limtiaco, J.F.K.; Jones, C.J.; Larive, C.K. Characterization of Heparin Impurities with HPLCNMR Using Weak Anion-Exchange Chromatography. // Anal. Chem. – 2009. – Vol. 81, № 24. – P. 10116–10123.

8. Manzoori J., Jouyban A., Amjadi M., Ramezani A. // Journal of Applied Spectroscopy. – 2013. – Vol. 80, № 1. – P. 104–110.

9. Nemcova I. Determination of Heparin Using Flow Injection Analysis with Spectrophotometric Detection / I. Nemcova, P. Rychlovsky, M. Havelcova // J. Analytica Chimica Acta. – 1999. – Vol. 401, № 1–2. – P. 223–228.

10. Pierson-Perry J.F. Development and characterization of an automated assay of effective heparin activity in plasma / J.F. Pierson-Perry, D.M. Obzansky, J.P. Mizzer // Clin. Chem. – 1987. – Vol. 33, № 9. – P. 1630–1634.

11. Rahul P. Patel, Christian Narcowicz, Joseph P. Hutchinson, Emily F. Hilder, Glenn A. Jacobson // J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2008. – Vol. 46. – P. 30–35.

12. Sun Wei, Ding Yaqin, Jiao Kui. Electrochemical Studies on the Interaction of Heparin with Crystal Violet and Analytical Application // J. of Analytical Chem. – 2006. – Vol. 61, № 4. – P. 359–364.

13. Бекровский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Козлов А.А. – М.: РЕНАМ, 2011. – С. 15.

14. Чазов Е.И., Лакин К.М. Антикоагулянты и фибринолитические средства. – М.: Медицина, 1975. – 310 с.

### References

1. Determination of over sulfated chondroitin sulfate and derma tan sulfate in heparin sodium using anion-exchange chromatography with UV detection. Dionex Application Note 235. www.dionex.com. 2010.

2. Ghous T. Flow Injection Determination of Heparin by Inhibition of Ribonuclease (Rnase). // Jour. Chem. Soc. Pak., 2004. Vol. 26, no. 1. pp. 28–34.

3. Heparin Sodium, USA Pharmacopeia Forum. 2009. pp. 1–4.

4. Jaques L.B. A method for the determination of heparin in blood / L.B. Jaques, F.C. Monkhouse, M. Stewart // J. Physiol. 1949. Vol. 109. pp. 41–48.

5. Jan Langmaier, Jiri Olsak, Eva Samcova, Zdenek Samec, Antonin Trojanek // Electroanalysis. 2006. Vol. 18, no. 2. pp. 115–120.

6. Khokhlov. V.Yu., Selemenev V.F., Khohlova O.N., Shcherbinin R.L // Pharmaceutical Chemistry Journal. 1999. Vol. 33, no. 8. pp. 450–451.

7. Limtiaco, J.F.K.; Jones, C.J.; Larive, C.K. Characterization of Heparin Impurities with HPLCNMR Using Weak Anion-Exchange Chromatography. // Anal. Chem. 2009. Vol. 81. no. 24. pp. 10116–10123

8. Manzoori J., Jouyban A., Amjadi M., Ramezani A. // Journal of Applied Spectroscopy. 2013. Vol. 80, no. 1. pp. 104–110.

9. Nemcova I. Determination of Heparin Using Flow Injection Analysis with Spectrophotometric Detection / I. Nemcova, P. Rychlovsky, M. Havelcova // J. Analytica Chimica Acta, 1999. Vol. 401, no. 1–2. pp. 223–228.

10. Pierson-Perry J.F. Development and characterization of an automated assay of effective heparin activity in plasma / J.F. Pierson-Perry, D.M. Obzansky, J.P. Mizzer // Clin. Chem. 1987. Vol. 33, no. 9. pp. 1630–1634.

11. Rahul P. Patel, Christian Narcowicz, Joseph P. Hutchinson, Emily F. Hilder, Glenn A. Jacobson // J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008. Vol. 46. pp. 30–35.

12. Sun Wei, Ding Yaqin, Jiao Kui. Electrochemical Studies on the Interaction of Heparin with Crystal Violet and Analytical Application // J. of Analytical Chem. 2006. Vol. 61. no. 4. pp. 359–364.

13. Bekrovsky A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Kozlov A.A. M.: RENAM, 2011. pp. 15. Ghous T. Flow Injection Determination of Heparin by Inhibition of Ribonuclease (Rnase). // Jour. Chem. Soc. Pak., 2004. Vol. 26, no. 1. pp. 28–34.

14. Chazov E.I., Lakin K.M. Anticoagulant and fibrinolytic agents. M.: Medicine, 1975. 310 p.

### Рецензенты:

Слепченко Г.Б., д.х.н., профессор кафедры физической и аналитической химии, ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск;

Колпакова Н.А., д.х.н., профессор кафедры физической и аналитической химии, ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск.

Работа поступила в редакцию 01.07.2013.