

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.

Series: Veterinary sciences

ISSN 2518–7554 print

ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet10622

<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 543:544.6.076.326

A new spectrophotometric method analysis of adrenaline in pharmaceuticals based on laccase-like nanozymes

O. M. Demkiv^{1,2✉}, N. Ye. Stasyuk¹, G. Z. Gayda¹, N. M. Grynychyshyn², O. T. Novikevuch²,
O. G. Demchuk², M. V. Gonchar¹

¹Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, Ukraine

²Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv, Ukraine

Article info

Received 22.04.2022

Received in revised form

23.05.2022

Accepted 24.05.2022

Institute of Cell Biology, National
Academy of Sciences of Ukraine,
Drahomanov Street 14/16,
Lviv 79005, Ukraine.
Tel.: +38-067-672-36-95
E-mail: olgademkiv81@gmail.com

Stepan Gzhytskyi National
University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies Lviv,
Pekarska Str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.

Demkiv, O. M., Stasyuk, N. Ye., Gayda, G. Z., Grynychyshyn, N. M., Novikevuch, O. T., Demchuk, O. G., & Gonchar, M. V. (2022). A new spectrophotometric method analysis of adrenaline in pharmaceuticals based on laccase-like nanozymes. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 24(106), 142–148. doi: 10.32718/nvlvet10622

Nanozymes, which have high enzyme-like activity of natural enzymes, are very promising for analytical purposes, in particular, for the development of methods for sensitive, quantitative detection of practically important analytes – biomarkers of common diseases or pharmaceutical products. Recently, it has been reported that artificial enzymes with laccase-like activity or “nanolaccases (nLacs),” can serve as catalytic elements for the creation of sensitive methods for catecholamines. Our work aimed to obtain laccase-like nanozymes and characterize and demonstrate their suitability for spectrophotometric adrenaline (AD) analysis. In this article, we report on preparing five hexacyanoferrate nanoparticles (HCF NPs) that possess laccase-like activity, particularly, Co-HCF, Ni-HCF, Mn-HCF, Zn-HCF, and Cu-HCF. Among the investigated nLacs, Cu-HCF was selected and characterized. It was shown that Cu-HCF reveals the highest activities, is stable in various pH conditions in the range 3.0–6.5, and has satisfactory stored stability. A new spectrophotometric method for the quantitative detection of AD was created using the selected nLacs. The linearity of the proposed method is in the range from 5 μM to 50 μM (0.66–11 $\mu\text{g/ml}$), and the limit of detection is 1.5 μM (0.33 $\mu\text{g/ml}$), which is lower than that catalyzed by native laccase (1.15 $\mu\text{g/ml}$). The proposed method was tested on the real samples of pharmaceuticals, and the obtained data agree with the data declared by the producer. The resulting nLacs have great potential for use in catalysis of mimetics, environmental restoration, and sensor design. Thus methods, the obtained Cu-HCF has great potential application in spectrophotometric and biosensor method for analysis of biologically active toxic compounds in surface waters.

Key words: spectrophotometric method, laccase-like nanozymes, nanolaccase, adrenaline analysis, pharmaceuticals.

Новий спектрофотометричний метод за використання лакказних нанозимів для аналізу адреналіну в фармацевтичних препаратах

О. М. Демків^{1,2✉}, Н. Є. Стасюк¹, Г. З. Гайда¹, Н. М. Гринчишин², О. Т. Новікевич², О. Г. Демчук²,
М. В. Гончар¹

¹Інститут біології клітини НАН України, м. Львів, Україна

²Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна

Нанозими (НЗ), що володіють високою ферментоподібною активністю природних ензимів, є сьогодні дуже перспективними для аналітичних цілей, зокрема для розроблення методів високочутливої кількісної детекції практично важливих аналітів – біома-

ркерів поширених захворювань або фармацевтичних продуктів. Недавні дослідження повідомляють, що штучні ферменти з псевдолактазою активністю або “нанолакази” можуть служити каталітичним елементом для створення чутливих методів аналізу катехоламінів. Метою нашої роботи було отримати лакказоподібні-нанозими, охарактеризувати та продемонструвати їх придатність для спектрофотометричного методу аналізу адреналіну (АД). В цій статті ми повідомляємо про отримання п'яти типів гексаціанофератних наночастинок (HCF НЧ), які володіли лакказною активністю: Co-HCF, Ni-HCF, Mn-HCF, Zn-HCF та Cu-HCF. Серед досліджуваних “нанолаказ, нЛак” було відібрано Cu-HCF НЗ, які мали найвищу активність, були стійкі в різних умовах, таких як рН 3,0–6,5, висока солоність та зберіганні активності протягом шести місяців. За використання відібраних нЛак, було створено новий спектрофотометричний метод кількісного визначення АД. Його лінійність зберігається в межах 5–50 мкмоль (0,66–11 мкг/мл), а порогова чутливість – 1,5 мкмоль (0,33 мкг/мл), що є нижче, ніж каталізується істинною лакказою (1,15 мкг/мл). Цей метод з Cu-HCF НЗ апробували на реальних фармацевтичних зразках, що містять АД, і одержані дані добре корелюють із результатами, заявленими виробником. Таким чином, отримані НЗ Cu-HCF мають великий потенціал до застосування спектрофотометричних та біосенсорних методах аналізу для виявлення біологічно активних токсичних сполук у поверхневих водах.

Ключові слова: спектрофотометричний метод, лакказні нанозими, нанолакази, аналіз адреналіну, фармацевтичні препарати.

Вступ

Виявлення біологічно активних токсичних фармацевтичних сполук та їх метаболітів у поверхневих водах викликає велике занепокоєння людства (Akerman-Sanchez & Rojas-Jimenez, 2021; Massima Mouele et al., 2021) та становить небезпеку для здоров'я (Rebollar-Pérez et al., 2016). Фармацевтичне виробництво стало значним джерелом шкідливих хімічних речовин як забруднювачів навколишнього середовища (Bradley et al., 2020). Навіть після очисних споруд концентрації токсичних речовин у стічних водах цих заводів можуть перевищувати безпечні значення в 10–1000 разів. Крім того, домогосподарства та лікарні причетні до викидів фармацевтичних препаратів у міські стічні води (Bradley et al., 2020).

Серед хімічних речовин, виявлених у стічних водах, найбільш небезпечними для людини є деякі анальгетики, катехоламіни та препарати, що застосовуються в неврології і психіатрії (Rana et al., 2017). В літературі описано про шкідливий вплив цих речовин на навколишнє середовище, тому виявлення та кількісна оцінка згаданих аналітів необхідні не лише для контролю якості води, особливо питної, а й для діагностики та моніторингу різних станів здоров'я (Taylor, 2015; Bradley et al., 2020).

Катехоламіни – норадреналін, адреналін (також званий епінефрином) і дофамін є ключовими нейромедіаторами в симпатичній нервовій системі, оскільки вони стимулюють адренергічні рецептори в найрізноманітніших клітинах (McCorry, 2017). Високі концентрації адреналіну (АД) добре корелюють з глікогенолізом в печінці, гіпоглікемією, інфарктом міокарда, ліполізом у жировій тканині та частотою серцевих скорочень (Peaston et al., 2004). Він є важливим біомаркером хвороби Паркінсона (Emamzadeh & Surguchov, 2018) та інших зловиясних новоутворень (Zuber et al., 2011). Так, АД та інші катехоламіни в надмірній кількості секретуються феохромоцитомами (пухлинами надниркових залоз) його рівень може досягати в плазмі 1000–10 000 нг/л. Концентрація ендogenous АД в плазмі в дорослих у стані спокою зазвичай становить менше 10 нг/л, але може збільшуватися в 10 разів під час фізичного навантаження і в 50 разів або більше під час стресу. Парентеральне його введення пацієнтам з невідкладною медичною допомогою може призвести до концентрації в плазмі 10 000–100 000 нг/л (Baselt & Cravey, 1989). Отже, АД

має потужний вплив на фізіологічні функції; високий рівень концентрації може викликати інтоксикацію, ураження печінки і навіть серцеві напади (Montaño Osorio et al., 2021), тому у фармацевтичних препаратах має бути вказана точна концентрація.

Повідомлялося про різноманітні аналітичні методи визначення АД, серед них рідинна хроматографія (Thomas et al., 2006), спектрофотометрія (Bibire et al., 2007), капілярний електрофорез (Liu et al., 2018), флуориметрія (Menon et al., 2016), рідинна хроматографія високого тиску та круговий дихроїзм (Kojlo & Calatayud, 1990) – які характеризуються низькою вибірковістю, високими витратами та затратами часу. На сьогодні є потреба в розробці селективних, чутливих і водночас недорогих методів аналізу практично важливих аналітів – біомаркерів найбільш поширених захворювань або в фармацевтичних продуктах. Соціально-економічна значущість розробки дешевших методів полягає у потребі заміни природних ферментів недорогими штучними каталізаторами в аналітичних наборах, що може привести до підвищення чутливості, спрощення процедури аналізу.

Природні ферменти, зокрема лакказа, є біокаталізатором і може ефективно каталізувати багато реакцій через широку субстратну специфічність органічних і неорганічних субстратів та каталітичну активність (Stasyuk et al., 2020). Завдяки тому, що природна лакказа має широку субстратну специфічність і високу каталітичну активність, вона здатна ефективно каталізувати реакції окиснення багатьох органічних та неорганічних сполук. Тому лакказу часто використовують в різних галузях промисловості, а саме для детоксикації та знебарвлення стічних вод і для біодеградації ксенобіотиків. Дуже часто вона є ключовий інструмент для розробки методів аналізу фенольних похідних.

Хоча природні ферменти широко використовуються, існують деякі недоліки, які необхідно усунути для практичного застосування, наприклад, такі як висока вартість, складна схема очищення, низька термічна стабільність, нестабільність в умовах навколишнього середовища.

Штучні нанорозмірні ферменти або нанозими (НЗ), мають кращі каталітичні властивості порівняно з природними ферментами та проявляють високу стійкість та нижчу собівартість (Stasyuk et al., 2020). Зокрема великий інтерес є до НЗ, які володіють лакказною активністю (“нанолаказ”), як каталітичних елементів для створення нових методів аналізу АД (Kojlo &

Calatayud, 1990; Menon et al., 2016), що є актуальним завданням на сьогодні.

Метою роботи було отримати стійкі до навколишнього середовища нанозими, які володіють лакказною активністю простим методом, та розробити новий спектрофотометричний метод з “нанолаказами” для аналізу АД.

Матеріал і методи досліджень

Для синтезу Fe-гексаціанофератних наночастинок (HCF НЧ) розчин $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10,84 г у 30 мл дистильованої води) додавали до розчину $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (12,7 г у 60 мл дистильованої води). Реакційну суміш інтенсивно перемішували протягом 5 хв. Блакитний осад центрифугували, тричі промивали водою та один раз етанолом, а потім сушили при кімнатній температурі.

Для синтезу Co-HCF НЧ розчин $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,59 г у 10 мл дистильованої води) додавали до розчину $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1,10 г у 10 мл дистильованої води) та 0,4 мл розчину гідроксиду амонію (28 %). Реакційну суміш інтенсивно перемішували протягом 5 хв. Осаджені НЧ Co-ПС центрифугували, тричі промивали водою, один раз етанолом і сушили.

Синтез Ni-HCF НЧ здійснювали використовуючи розчин $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8,43 г у 10 мл дистильованої води), до якого додавали розчин $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2,20 г у 10 мл дистильованої води). Реакційну суміш інтенсивно перемішували протягом 5 хв. Осад NiHCF центрифугували, тричі промивали водою, один раз етанолом і сушили при кімнатній температурі.

Синтез Mn-HCF НЧ здійснювали використовуючи розчин $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10,23 г у 10 мл дистильованої води), до якого додавали розчин $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2,20 г у 10 мл дистильованої води). Реакційну суміш інтенсивно перемішували протягом 5 хв. Осад Mn-HCF центрифугували, тричі промивали водою, один раз етанолом і сушили при кімнатній температурі.

Для синтезу Zn-HCF НЧ, розчин $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (12,13 г у 10 мл дистильованої води) додавали до розчину $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2,20 г у 10 мл дистильованої води). Реакційну суміш інтенсивно перемішували протягом 5 хв. Осад Zn-HCF центрифугували, тричі промивали водою, один раз етанолом і сушили при кімнатній температурі.

Для синтезу Cu-HCF НЧ розчин $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10,84 г у 30 мл дистильованої води) додавали до розчину $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1,10 г у 10 мл дистильованої води). Реакційну суміш інтенсивно перемішували протягом 30 хв. Осад центрифугували, тричі промивали водою та один раз етанолом, а потім сушили при кімнатній температурі.

Визначення оксидоредуктазної активності та УФ-видиму спектроскопію проводили для всіх отриманих НЧ. Дослідження пероксидазної активності НЧ проводили у 50 мМ ацетатного буфері, рН 4,5, що містив 8,8 мМ H_2O_2 та 1 мМ 2,2-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова) кислоту, діамонієву сіль (АБТС), в кінцевому об'ємі 1 мл, а лакказоподібну активність проводили за тих же умов, але без додавання H_2O_2 . У реакційну суміш вносили тестова-

ний зразок і аналізували кінетичним методом утворений продукт реакції при 420 нм. За одиницю активності (Од.) приймали таку кількість ензимоподібних НЧ, яка забезпечує утворення 1 мкмоль забарвленого продукту за 1 хв за описаних вище умов на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC з використанням програмного забезпечення “UVProbe 2.20”, приймаючи для окисленого АБТС коефіцієнт мілімолярної екстинкції $\varepsilon = 36,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Оптичні властивості синтезованих гексаціанофератних НЧ характеризували УФ-видимою спектроскопією (200-800 нм) за допомогою спектрофотометра Shimadzu UV-1650 PC із використанням стандартного програмного забезпечення “UVProbe 2.20”.

Для морфологічного аналізу мікро/наночастинок використовували сканувальний електронний мікроскоп СЕМ-мікроаналізатор РЕММА-102-02 (Суми, Україна). Зразки із концентрацією 0,05 мг·мл⁻¹ наносили крапельним методом на кремнієву підкладку товщиною 0,05 см, діаметром 0,5 см. Після висихання, зразки фіксували плівкою, що формувалася розчином *Бутварної* смоли В-98 (Sigma, St. Louis, MO, USA) у 1,5 % хлороформі за дії ультразвуку частотою 24 кГц. В експериментах відстань від останньої лінзи мікроскопа до зразка (WD) становила від 24,4 мм до 24,7 мм; напруга прискорювача становила 20 еВ; використовували збільшення різної кратності: $\times 80$; $\times 200$; $\times 1200$; $\times 1500$.

Досліди проводились у трьох-чотирьох повторях. Для кожної вибірки показників визначали середнє арифметичне значення (М) та похибку середнього (М). Розрахунок статистичних показників і побудову графіків проводили за допомогою програми Origin 7.5. Лінеаризацію графіків проводили за рівнянням регресії $Y = A + BX$ (А і В – параметри рівняння), розраховували коефіцієнт кореляції R та рівень достовірності зв'язку p (для події R = 0).

Результати досліджень

Нами синтезовано НЧ Пруської блакиті (Fe(III)HCF) та п'ять різних типів гексаціанофератних (HCF) НЧ двовалентних іонів перехідних та благородних металів: Феруму, Мангану, Цинку, Кобальту, Нікелю та Купруму із загальною формулою $\text{M}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_z \cdot x\text{H}_2\text{O}$. НЧ формували при взаємодії солі гексаціаноферат(II) калію ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) або гексаціаноферат(III) калію ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) з відповідними солями різних перехідних чи благородних металів.

Для усіх отриманих HCF НЧ досліджували оксидоредуктазну активність в розчині ацетатного буфера рН 4,5 за використання як хромогену – АБТС. При аналізі псевдопероксидазної активності додатково використовували як субстрат Гідроген пероксиду. Як видно з наведених результатів у табл. 1, усі отримані НЧ володіли оксидоредуктазною активністю, з них Fe-HCF виявляли тільки пероксидазну активність, а п'ять інших типів гексаціанофератних НЧ: Co-HCF, Ni-HCF, Mn-HCF, Zn-HCF та Cu-HCF лише лакказну активність. Серед досліджуваних НЗ найвищу лакказоподібну активність мають Cu-HCF НЧ в діапазоні рН від 3,0–6,0.

Таблиця 1

Оксидоредуктазна активність в розчині гексаціанорфератних НЧ, отриманих хімічним синтезом

НСФ НЧ	Активність, Од./мг	
	псевдолакказна	псевдопероксидазна
Co-HCF	0,075 ± 0,005	-
Ni-HCF	0,025 ± 0,005	-
Mn-HCF	0,5 ± 0,01	-
Zn-HCF	0,75 ± 0,02	-
Cu-HCF	0,86 ± 0,005	-
Fe-HCF	-	1,1 ± 0,01

Для отриманих НЧ досліджували спектральні властивості, знімаючи спектри в діапазоні 300-800 нм. Всі НЧ мали пік поглинання у видимій ділянці світла (рис. 1) у відповідному діапазоні, моно-НЧ (один метал у зовнішній сфері) мали чітко виражений один пік, Fe-HCF (710 нм), Cu-HCF (545 нм), Co-HCF (560 нм), Ni-HCF (570 нм), Mn-HCF (475 нм) та Zn-HCF (480 нм).

Для Cu-HCF та Zn-HCF НЧ, які володіли вищою лакказною активністю, досліджували структурно-морфологічну характеристику за використання СЕМ (надає інформацію про розмір, розподіл та форму частинок) та рентгено-спектральний мікроаналіз (XRM) (рис. 2).

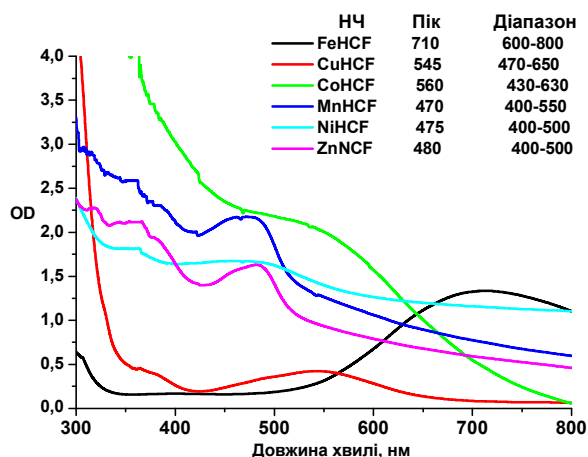
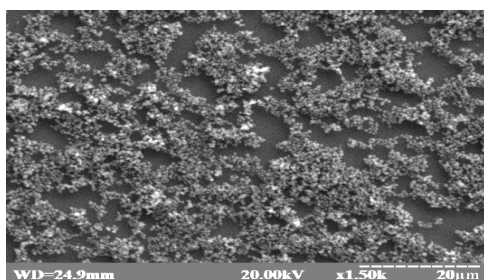
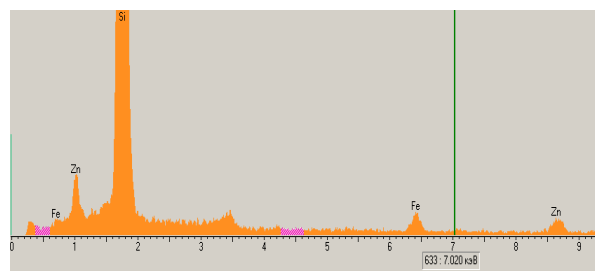


Рис 1. Ультрафіолетовий видимий спектральний аналіз НСФ НЧ

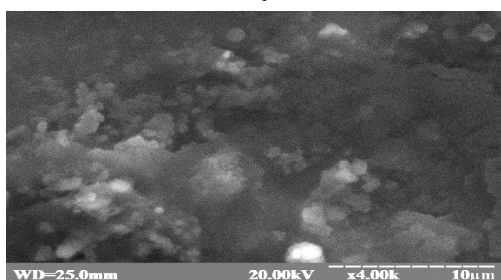
Як видно з рис. 2, Zn-HCF мають форму дрібних кульок з розміром менше ніж 2 мкм, Cu-HCF – неправильну форму кубів до 1 мкм. На XRM-зображеннях НЧ показано характерні піки, що відповідають електронним переходам відповідних перехідних металів, які входять до складу НЗ.



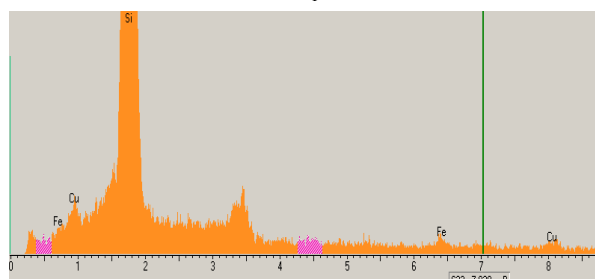
A₁



B₁



A₂



B₂

Рис. 2. Структурно-морфологічна характеристика Zn-HCF та Cu-HCF НЧ: зліва – СЕМ-зображення (А); справа – рентгеноспектральний мікроаналіз (Б)

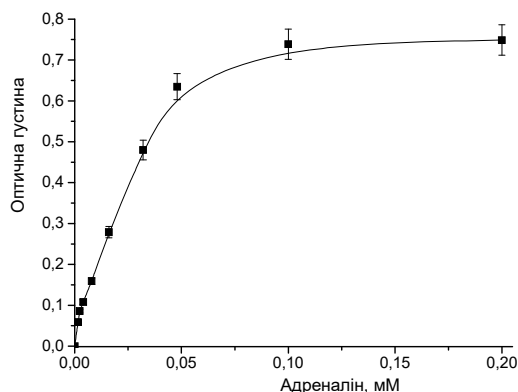
Відібрані Cu-HCF “нанолакази” є стійкими, не втрачають активності при підвищеній температурі до 40 °С чи в розчині 1 М NaCl та є стабільними, протягом половини року їхня активність знижується лише на 25 % при зберіганні за 4 °С. Отже, вони мають переваги порівняно з істинною лакказою, оскільки володіють підвищеною стабільністю та більшою доступністю завдяки більш простій та дешевій методиці приготування та можуть використовуватись для створення методів аналізу важливих аналітів.

Кількісне визначення АД є важливим для діагностики захворювання та фармацевтичного аналізу. Отримані нами “нанолакази” Cu-HCF є потенційними претендентами для розробки спектофотометричного методу (СФ) аналізу АД. Cu-HCF НЗ, як і лаккази здатні каталізувати окислення АД, утворюючи забарвлений окислений продукт – аденохром, який є основою для розробки методу визначення цільового аналіту. На рис. 3 показано схему реакції, що лежить в основі створеного методу.



Рис. 3. Схема реакцій, що лягла в основу методу визначення АД за використання Cu-NCF НЗ – міметика природної лаккази

Для дослідження залежності оптичної густини реакційної суміші від концентрації АД (0,66–10 мкг/мл), Cu-NCF в 50 мМ ацетатному буфері рН 4,5 змішували з АД та інкубували 10 хв. Після цього оптичну густину фотометрованої проби (окислюваний продукт)



вимірювали на спектрофотометрі при 475 нм проти “сліпої” проби (замість дослідного зразка додавали 0,2 мл дистильованої води). Будували калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації АД в пробі, результати показано на рис. 4. Для створеного методу було підібрано оптимальну концентрацію НЗ (хемоміметика лаккази) в фотометрованої пробі – 0,25 мкг/мл, час інкубації – 10 хв, оптимальне значення рН – 4,5, за таких умов спостерігалась вища оптична густина та вищий кут нахилу калібрувальної прямої.

Лінійність калібрувальної кривої для аналізу АД зберігається в межах 5–50 мкмоль (0,66–11 мкг/мл). Порогова чутливість методу – 1,5 мкмоль (0,33 мкг/мл), що є нижче, ніж для методу за використання природної лаккази (1,15 мкг/мл) (Wang et al., 2019). Отже, метод із залученням “нанолакказ” Cu-NCF є більш чутливим, ніж з істинною лакказою, через їх більш високу каталітичну активність.

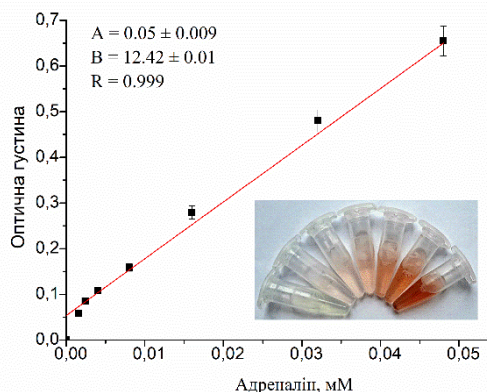


Рис. 4. Характеристика СФ методу за використання Cu-NCF НЗ: залежність оптичної густини реакційної суміші від концентрації АД (А) та діапазон лінійності методу (Б), час проведення реакції 10 хв

Розроблений метод апробовано на фармацевтичному зразку, яким служив розчин для ін’єкції в ампулах “Адреналін-Дарниця” (табл. 2), та проведене порівняння із результатами, заявленими виробником (ПрАТ “Фармацевтична фірма “Дарниця”). Було вказано такий склад цього фармацевтичного продукту: 1,82 мкг/мл епінефрину гідротартрату (адреналіну

тартрату). Досліджуваний розчин додатково містив метабісульфіт натрію (E223) і хлористий натрій.

Таким чином, значення концентрації АД у комерційному зразку, які були оцінені з використанням розробленого нами СФ методу за використання “нанолакказ” CuNCF і заявленого виробником, добре корелюють (табл. 2), з похибкою менше ніж 5 %.

Таблиця 2

Концентрація АД у фармацевтичному зразку “Адреналін-Дарниця”

Комерційний зразок	Концентрація АД, мМ		CV %	Виробник
	Заявлена виробником	Визначена методом		
Адреналін-Дарниця	5,57 ± 0,25	5,46 ± 0,25	2,01%	ПрАТ “Фармацевтична фірма “Дарниця”, Україна

Обговорення

АД, також епінефрин – гормон та медіатор мозкової речовини надниркових залоз, що входить до групи фізіологічно активних речовин – катехоламінів. Також це лікарський препарат “Адреналін/Епінефрин”, що належить до адренергічних препаратів (адреноміметиків), який використовують при глибоких розладах кровообігу (гемодинаміки), що бувають при за-

хворюваннях серцево-судинної системи, колапсі, деяких видах шоку (зокрема при анафілактичному), при алергічних захворюваннях, астматичних приступах, деяких отруєннях. Таким чином, простий, точний та високочутливий кількісний аналіз АД – один з важливих напрямків у сучасній аналітичній практиці, включаючи клінічні дослідження, є важливим для діагностики захворювання та фармацевтичного аналізу.

В літературі описано СФ метод аналізу АД за використання різних хромогенів. Перші спроби колориметричного визначення АД обмежувались реакцією взаємодії його з 1 мМ хлорамином в лужному середовищі при нагріванні (60 °С) та вимірюванні кінцевого кольорового продукту при 350 нм (Al-Abachi et al., 1989). Діапазон лінійності такого методу становив 0,4–28 мг/мл. Інший чутливий СФ метод базується на взаємодії АД з натрій нітритом та молібдатом амонію у кислому середовищі та вимірюванні кінцевого продукту при 475 нм (Kothari & Srinivasulu, 1989). В літературі описано метод за використання йодоформу в кислому середовищі (Rodriguez-Dopazo et al., 1989). Нещодавно запропоновано нові СФ методи визначення АД (Al-Ayash, 2008; Al-Ameri, 2016). Недоліком є чутливість до інтерферуючого впливу інших сполук.

Таким чином, недоліком усіх зазначених вище методів є низька селективність, використання неводних розчинників, тривалий час реакції, нагрівання тощо.

На сьогодні розвивається новий підхід для розробки СФ методів, зокрема, використання НЗ – міметиків природних ферментів (Wang et al., 2019; Demkiv et al., 2021). Нами отримано ефективні нанолаккази, а саме Cu-HCF і Zn-HCF, які володіють чудовою активністю, подібною до істинної лаккази, здатної окислювати ендокринний гормон АД. Нами також продемонстровано використання Cu-HCF НЗ з лакказною активністю для розроблення спектрофотометричного методу аналізу АД. Принцип методу ґрунтується на реакції окиснення АД НЗ Cu-HCF та утворенні забарвленого продукту аденохрому, який кількісно можна аналізувати при 475 нм. Лінійність зберігається в межах від 5 мкМ до 50 мкМ (0,66 – 11 мкг/мл). Порогова чутливість методу за використання природньої лаккази – 1,5 мкМ (0,33 мкг/мл), що є нижче, ніж (1,15 мкг/мл). Розроблений нами метод за чутливістю є дуже близьким до описаного в літературі методу кількісного визначення АД за допомогою смартфона на основі НЗ Cu-HCF (Wang et al., 2019), де нижня межа визначення АД (0,31 мкг/мл) була майже така ж, як і для нашого методу, тільки методика приготування наночастинок є складнішою.

Розроблений нами метод визначення АД за використання міметиків лаккази є кращим серед СФ методів через простоту процедури аналізу, вищу чутливість та дешевим за собівартістю порівняно з ензиматичними методами за використання лаккази. Саме тому НЗ Cu-HCF з активністю, подібною до лаккази, має великий потенціал до застосування у біосенсорному аналізі для виявлення біологічно активних токсичних сполук у поверхневих водах.

Висновки

Здійснено синтез гексаціанофератних наночастинок (HCF НЧ), які володіють лакказною активністю: Co-HCF, Ni-HCF, Mn-HCF, Zn-HCF та Cu-HCF. Проведено структурну характеристику за допомогою фізичних методів – сканувальної електронної мікроскопії та рентгеноспектрального аналізу для двох типів “нанолакказ” Cu-HCF та Zn-HCF, які мали найвищу активність. Показано, що НЗ Cu-HCF мають кращу

стабільність порівняно з природним ферментом та є стійкими в широкому діапазоні рН від 3,0 до 6,5. Створено новий СФ метод кількісного визначення АД за використання НЗ міметиків лаккази в межах 5–50 мкМ (0,66 – 11 мкг/мл). Розроблений метод було апробовано на реальних зразках фармацевтичних препаратів. Отримані нами “нанолаккази” можуть бути використані як каталітичні елементи при конструюванні амперометричних сенсорів.

Подяка

Ця робота частково фінансувалася НАН України (програма “Розумні сенсорні пристрої нового покоління на основі сучасних матеріалів і технологій”, проєкт 0118U006260), Національним фондом досліджень України (проєкт 0100/02.2020 “Розробка нових нанозимів як біосенсорів каталітичних елементів для ферментних наборів та хіміо/біосенсорів”).

Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

References

- Akerman-Sanchez, G., & Rojas-Jimenez, K. (2021). Fungi for the bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants: A bioengineering approach to water treatment. *Environ. Adv.*, 4, 100071. DOI: 10.1016/j.envadv.2021.100071.
- Al-Abachi, M., Al-Ghabsha, M., & Shahbaz, N. A. (1989). Spectrophotometric Determination of microgram amounts of adrenaline with chloranil. *Microchemical Journal*, 31(3), 272–274. DOI: 10.1016/0026-265X(85)90113-4.
- Al-Ameri, S. A. H. (2016). Spectrophotometric determination of adrenaline in pharmaceutical preparations. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(2), S1000–S1004. DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.10.001.
- Al-Ayash, A. S. (2008). A new sensitive spectrophotometric method for the determination of adrenaline in pharmaceutical preparations. *Journal of Al-Nahrain University*, 11(3), 46–54. DOI: 10.22401/JNUS.11.3.05.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Santos, H. M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact*, 18, 200. DOI: 10.1186/s12934-019-1248-0.
- Baselt, R. C., & Cravey, R. H. (1989). Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Vol. 8. Davis, CA: Biomedical publications, 95–104.
- Bibire, N., Christopoulos, L., Apostu, M., & Dorneanu, V. (2007). Quantitative determination of adrenaline by visible spectrophotometric method. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.*, 111(3), 779–782. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18293717>.
- Bradley, P. M., Journey, C. A., Button, D. T., Carlisle, D. M., Huffman, B. J., Qi, S. L., Romanok, K. M., & Van Metre, P. C. (2020). Multi-region assessment of pharmaceutical exposures and predicted effects in USA

- wadeable urban-gradient streams. *PLoS One*, 15(1), e0228214. DOI: 10.1371/journal.pone.0228214.
- Demkiv, O., Stasyuk, N., Gayda, G., & Gonchar, M. (2021). Highly Sensitive amperometric sensor based on laccase-mimicking metal-based hybrid nanozymes for adrenaline analysis in pharmaceuticals. *Catalysts*, 11(12), 1510. DOI: 10.3390/catal11121510.
- Emamzadeh, F. N., & Surguchov, A. (2018). Parkinson's disease: Biomarkers, Treatment, and Risk Factors. *Front. Neurosci*, 12, 612. DOI: 10.3389/fnins.2018.00612.
- Kojło, A., & Calatayud, J. M. (1990). Spectrophotometric determination of adrenaline with an oxidative column in a FIA assembly. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 663–666. DOI: 10.1016/0731-7085(90)80098-a.
- Kothari, Y. K., & Srinivasulu, K. (1989). A New Spectrophotometric Determination of Adrenaline with CDTA. *Asian Journal of Chemistry*, 1(1), 42–46. URL: https://asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=1_1_7
- Liu, C., Zhang, J., Zhang, X., Zhao, L., & Shuang, L. (2018). Enantiomeric separation of adrenaline, noradrenaline, and isoprenaline by capillary electrophoresis using streptomycin-modified gold nanoparticles. *Mikrochim. Acta*, 185, 227. DOI: 10.1007/s00604-018-2758-x.
- Massima Mouele, E. S., Tijani, J. O., Badmus, K. O., Pe-reao, O., Babajide, O., Zhang, C., Shao, T., Sonin, E., Tarasenko, V., Fatoba, O. O., Laatikainen, K., & Petrik, L. F. (2021). Removal of Pharmaceutical Residues from Water and Wastewater Using Dielectric Barrier Discharge Methods—A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18, 1683. DOI: 10.3390/ijerph18041683.
- McCorry, L. K. (2007). Physiology of the Autonomic Nervous System. *Am. J. Pharm. Educ.*, 71, 78. DOI: 10.5688/aj710478.
- Menon, S., Jesny, S., Sivasankaran, U., & Girish, K. K. (2016). Fluorometric Determination of Epinephrine: A Green Approach. *Anal. Sci.*, 32, 999–1001. DOI: 10.2116/analsci.32.999.
- Montaño Osorio, C., Bonilla-Martínez, D., Villegas-González, M. A., & Obaya Valdivia, A. E. (2021). Validation of a Spectrophotometric Analytical Method for the Quantitative Determination of Adrenaline in Injectable Pharmaceutical Formulations. *American Journal of Pharmacological Sciences*, 9(1), 40–45. DOI: 10.12691/ajps-9-1-4.
- Peaston, A. E., Evsikov, A. V., Graber, J. H., Vries, W. N., Holbrook, A. E., Solter, D., & Knowles, B. B. (2004). Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev. Cell.*, 7, 597–606. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.09.004.
- Rana, R. S., Singh, P., Kandari, V., Singh, R., Dobhal, R., Gupta, S. (2017). A review on characterization and bi-oremediation of pharmaceutical industries' wastewater: An Indian perspective. *Appl. Water Sci.*, 7, 1–12. DOI: 10.1007/s13201-014-0225-3.
- Rebollar-Pérez, G., Campos-Terán, J., Ornelas-Soto, N., Méndez-Albores, A., & Torres, E. (2016). Biosensors based on oxidative enzymes for detection of environmental pollutants. *Biocatalysis*, 1, 118–129. DOI: 10.1515/boca-2015-0010.
- Rodriguez-Dopazo, M. J., Silva, M., & Pérez-Bendito, D. (1989). Indirect kinetic method for the quantitative determination of catecholamines in pharmaceuticals. *J. Microchem*, 39(2), 235–240. DOI: 10.1016/0026-265X(89)90037-4.
- Stasyuk, N., Smutok, O., Demkiv, O., Prokopiv, T., Gayda, G., Nisnevitch, M., & Gonchar, M. (2020). Synthesis, Catalytic Properties and Application in Biosensorics of Nanozymes and Electronanocatalysts: A Review. *Sensors*. 20(16), 4509. DOI: 10.3390/s20164509.
- Taylor, D. (2015). The Pharmaceutical Industry and the Future of Drug Development. In *Pharmaceuticals in the Environment*, 41, 1–33. DOI: 10.1039/9781782622345-00001.
- Thomas, A., Geyer, H., Mester, H.J., Schänzer, W., Zimmermann, E., Thevis, M. (2006). Quantitative determination of Adrenaline and Noradrenaline in Urine Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*, 64, 587–591. DOI: 10.1365/s10337-006-0067-8.
- Wang, J., Huang, R., Qi, W., Su, R., Binks, B. P., & He, Z. (2019). Construction of a bioinspired laccase-mimicking nanozyme for the degradation and detection of phenolic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 254, 452–462. DOI: 10.1016/j.apcatb.2019.05.012.
- Zuber, S. M., Kantorovich, V., & Pacak, K. (2011). Hypertension in Pheochromocytoma: Characteristics and Treatment. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am*, 40, 295–311. DOI: 10.1016/j.ecl.2011.02.002.