

УДК 616-036:543.42:001.891

DOI <https://doi.org/10.32782/health-2024.3.16>

РОЗРОБЛЕННЯ ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ШВИДКОСТІ ОКИСНЕННЯ ДОФАМІНУ В МОДЕЛЬНІЙ ХІМІЧНІЙ СИСТЕМІ

Удовицький Владислав Віталійович,
аспірант кафедри промислової фармації

Київського національного університету технологій та дизайну
ORCID: 0000-0003-0188-9553

Бессарабов Володимир Іванович,

доктор технічних наук, професор,
професор кафедри промислової фармації

Київського національного університету технологій та дизайну,
Інститут фізико-органічної хімії та вуглехімії імені Л. М. Литвиненка НАН України
ORCID: 0000-0003-0637-1729

Хвороба Паркінсона посідає друге місце за поширеністю серед нейродегенеративних розладів. Це захворювання викликане прогресувальним пошкодженням дофамінергічних нейронів у мозку, що призводить до зменшення кількості дофаміну – нейромедіатора, який відповідає за регуляцію рухових функцій. Повідомляється, що дофамін є нестабільною молекулою і може піддаватися процесам окиснення, що призводить до зниження його рівня і, відповідно, до виникнення рухових розладів. До того ж при окисненні цього нейромедіатора утворюється велика кількість реактивних і токсичних побічних продуктів, які пошкоджують нейронні клітини. Зважаючи на те, що окиснення дофаміну відіграє значущу роль у розвитку та прогресуванні хвороби Паркінсона, перспективними є дослідження, спрямовані на вивчення кінетичних закономірностей цього процесу.

Мета роботи – розробити та валідувати спектрофотометричну методику для вивчення кінетики окиснення дофаміну в контрольованих умовах in vitro.

Запропонована спектрофотометрична методика визначення кінетики окиснення дофаміну в модельній хімічній системі базується на вимірюванні збільшення оптичного поглинання продуктів окиснення дофаміну, переважно дофамінохром, при довжині хвилі 500 нм залежно від часу. Проведено валідацію розробленої методики за такими валідаційними параметрами, як специфічність, лінійність, прецизійність та робастність.

Згідно з отриманими результатами процедури валідації підтверджено, що довжина хвилі 500 нм є специфічною для аналізу. Доведено, що методика є лінійною, адже коефіцієнт кореляції в інтервалі концентрацій дофаміну 80–120 % становить 0,995. Прецизійність методики підтверджено на рівні збіжності та відтворюваності. Доведено, що зміна температури проведення дослідження та довжини хвилі детектора суттєво не впливають на результати методики, що підтверджує робастність. Отже, розроблена спектрофотометрична методика дає змогу отримувати правильні й відтворювані результати визначення кінетики окиснення дофаміну, оскільки всі обрані валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності.

Розроблена методика створює основи для досліджень впливу різних активних фармацевтичних інгредієнтів на процес окиснення дофаміну, що, відповідно, сприятиме розробці нових лікарських засобів для лікування та профілактики хвороби Паркінсона.

Ключові слова: хвороба Паркінсона, дофамін, окиснення, валідація, спектрофотометрія.

Udovytskyi Vladyslav, Bessarabov Volodymyr. Development and validation of a spectrophotometric method for determining the rate of dopamine oxidation in a model chemical system

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder. This disease is caused by progressive damage to dopaminergic neurons in the brain, which leads to a decrease in the amount of dopamine, a neurotransmitter responsible for regulating motor functions. It is reported that dopamine is an unstable molecule and can undergo oxidation processes, which leads to a decrease in its level and, accordingly, the occurrence of motor disorders. In addition, the oxidation of this neurotransmitter produces a large number of reactive and toxic byproducts that damage neuronal cells. Given that dopamine oxidation plays a significant role in the development and progression of Parkinson's disease, research aimed at studying the kinetic patterns of this process is promising.

The aim of this work was to develop and validate a spectrophotometric technique for studying the kinetics of dopamine oxidation under controlled conditions in vitro.

The proposed spectrophotometric method for determining the kinetics of dopamine oxidation in a model chemical system is based on measuring the increase in the optical absorption of dopamine oxidation products, mainly dopaminochrome, at a wavelength of 500 nm as a function of time. The developed method was validated by such validation parameters as specificity, linearity, precision, and robustness.

According to the results of the validation procedure, it was confirmed that the wavelength of 500 nm is specific for the assay. The method has been proven to be linear, as the correlation coefficient in the dopamine concentration range of 80–120 % is 0.995. The accuracy of the method was confirmed at the level of convergence and reproducibility. It has been proven that changes in the test temperature and detector wavelength do not significantly affect the results of the method, which confirms its robustness. Thus, the developed spectrophotometric methodology allows obtaining correct and reproducible results for determining the kinetics of dopamine oxidation, since all selected validation characteristics meet the acceptance criteria.

The developed methodology creates the basis for research on the effect of various active pharmaceutical ingredients on the process of dopamine oxidation, which will contribute to the development of new drugs for the treatment and prevention of Parkinson's disease.

Key words: Parkinson's disease, dopamine, oxidation, validation, spectrophotometry.

Вступ. Хвороба Паркінсона є другим за поширеністю нейродегенеративним розладом, прогнозується, що в наступному поколінні її частота зросте майже вдвічі [1; 2]. Типовими клінічними ознаками цього захворювання є тремор у стані спокою, ригідність та брадикінезія з постуральною нестабільністю. Ці рухові порушення спричиняють прогресувальну інвалідизацію з порушенням повсякденної діяльності та зниженням якості життя [2]. Патофізіологія хвороби Паркінсона є багатофакторною та досі залишається не до кінця вивченою, однак вважається, що основним механізмом захворювання є прогресувальна втрата дофамінергічних нейронів та накопичення неправильно згорнутих білкових агрегатів α -синуклеїну у вигляді внутрішньоцитоплазматичних тілець Леві та нейритів в уражених ділянках мозку. В осіб із хворобою Паркінсона втрата дофамінергічних нейронів призводить до зниження продукування дофаміну – нейромедіатора, який відповідає за регуляцію рухових функцій [1; 3].

Дофамін належить до сімейства катехоламінів і є важливим нейромедіатором центральної нервової системи та відіграє ключову роль у регуляції рухів, когнітивних функціях, афекті, нейроендокринній секреції та багатьох інших фізіологічних процесах [3]. Поза мозком у високих концентраціях він активує α - і β -адренорецептори, завдяки чому його також застосовують при шоці різного генезу, артеріальній гіпотонії, гострій серцево-судинній і нирковій недостатності. Проте ця ж активність може викликати побічні ефекти, як-от тахікардія, ортостатична гіпотензія, нудота, блювота, запори, затримка й нетримання сечі [4; 5].

Зважаючи на численні функції, які виконує дофамін в організмі людини, його рівень має бути належно регульованим, адже незбалансована кількість цього нейромедіатора може бути пов'язана з розвитком не тільки хвороби Паркінсона, а й багатьох інших захворювань [4]. Повідомляється, що дофамін є нестабільною молекулою і може піддаватися багатьом перетворенням, більшість із яких зумовлена окисненням унаслідок

оксидативного стресу, що, відповідно, призводить до значного зниження його рівня й виникнення рухових розладів [5]. Літературні джерела підтверджують, що пошкодження дофаміну вільними радикалами та процес оксидативного стресу відіграють значну роль у патофізіології хвороби Паркінсона й інших нейродегенеративних розладів [6]. До того ж унаслідок окиснення дофаміну також може утворюватися велика кількість реактивних і токсичних побічних продуктів, включно з активними формами кисню (далі – АФК), дофаміновими хінонами та 3,4-дигідроксифеніацетальдегідом, які теж можуть спричинити додаткову нейродегенерацію [5–7].

Підсумовуючи вищевикладений матеріал, можна стверджувати, що вивчення процесів окиснення дофаміну *in vivo* та *in vitro* є актуальним завданням, оскільки це сприятиме отриманню даних щодо біохімічних механізмів, які впливають на функціонування нейротрансмітерів та допоможе розробити нові нейропротекторні підходи, спрямовані на підтримання оптимального рівня дофаміну та збереження його функціональності, а також створить нові можливості для наукових досліджень і розробки ефективних лікарських засобів для лікування та профілактики хвороби Паркінсона.

Мета роботи – розробити *in vitro*-методику для вивчення процесів окиснення дофаміну в контрольованих умовах, яка дасть змогу отримати дані про кінетику цього процесу та стане в пригоді для випробування різних терапевтичних стратегій.

З літературних джерел відомо, що автоокиснення дофаміну відбувається повільно, тому необхідно правильно дібрати середовище та окиснювальну систему, де дофамін буде досить швидко та стехіометрично окиснюватися. Методика повинна бути досить простою і забезпечувати вірогідні кінетичні вимірювання, а система – специфічною, тобто не повинна заважати визначенню.

У науково-літературних джерелах [8–11] повідомляється про деякі методики щодо вивчення

механізмів та кінетики окиснення дофаміну за допомогою спектрофотометричного методу. Наприклад, Pham A. N. та Waite T. D. [8] вивчали каталіз реакції окиснення дофаміну катіонами купруму та хлоридом натрію в буферному середовищі 3-(N-морфоліно)пропансульфонової кислоти при рН 7,4, щоб імітувати стан рН спинномозкової рідини. Їхнє дослідження показало, що в таких умовах автоокиснення протікає надзвичайно повільно, і понад 5 годин потрібно для окиснення 25 % 4 мкМ дофаміну в 0,2 М розчині NaCl. Наявність купруму в реакційній суміші збільшує швидкість реакції, однак недостатньо.

Натомість Sun Y. та його дослідницька група [9] вивчали взаємодію між дофаміном і катіонами заліза в діапазоні рН від 6,5 до 7,4, зосереджуючи увагу на накопиченні токсичних хінонів та утворенні активних форм кисню в процесі. Результати їхніх досліджень довели, що швидкість окиснення дофаміну та кількість утворених токсичних метаболітів залежить від значення рН і концентрації іонів заліза в системі, причому двовалентне залізо (Fe^{2+}) є значно ефективнішим у прискоренні окиснення, ніж тривалентне залізо (Fe^{3+}).

Florence T. M. та Stauber J. L. [10] досліджували вплив окисно-відновної пари катіонів магнію $\text{Mg}^{2+}/\text{Mg}^{3+}$ у середовищі фосфатного буфера рН 7,5. Процес окиснення забезпечувався безперервним барботуванням повітря, або додаванням пероксиду водню чи системи ксантин / ксантиноксидаза. Результати дослідження показали, що в таких умовах збільшення швидкості окиснення дофаміну досягається тільки в разі барботування повітря, але цей метод досить довготривалий та трудомісткий і не дає змоги досліджувати кінетику протікання реакції в повній мірі завдяки великим інтервалам між вимірами. Klegeris A. та його колеги [11] для ініціювання окиснення дофаміну запропонували використання лужного середовища гліцинового буфера рН 9,0, оскільки лише при значеннях рН вище 8,0 швидкість окиснення легко вимірювати. У цих умовах вони протягом години визначали максимум поглинання при довжині хвилі 386 нм, що відповідає дофамінхінону. Однак на практиці цей пік не був виявлений і реакція протікала досить довго.

Підсумовуючи вищенаведену інформацію, можна виокремити фактори, що збільшують швидкість окиснення дофаміну: лужне середовище (значення рН вище 8,0); наявність катіонів двовалентних металів та донора АФК. Базуючись на цій інформації, було розроблено нову спектро-

фотометричну методику визначення швидкості окиснення дофаміну.

Як середовище обрано гліциновий буферний розчин. Він застосовувався в роботі Klegeris A. та ін. [11]. Експериментальним шляхом доведено, що в ньому дофамін окиснювався швидше, ніж у фосфатному чи карбонатному буферних розчинах (дослідження проводили при однаковому значенні рН 8,0). рН буферного розчину був підвищений до значення 9,5 за допомогою використання розчину натрію гідроксиду. Це значення рН є найвищим прийнятним відповідно до проаналізованих робіт, і при подальшому підвищенні лужності швидкість окиснення дофаміну майже не змінюється.

Враховуючи літературні дані досліджень, як метал-каталізатор обрано двовалентне залізо (FeSO_4). А донором АФК був перекис водню як найпоширеніший у таких окиснювальних системах, а також природний окисник в організмі людини, що при взаємодії з катіонами Fe^{2+} утворює токсичні гідроксильні радикали. У розробленій системі наявні ці катіони, чим досягається додатковий механізм окиснення.

Здійснивши низку експериментальних досліджень, визначено склад реакційної системи, яка дає змогу досліджувати кінетику окиснення дофаміну. Вона містить такі речовини: гліциновий буферний розчин з рН 9,5; $3,2 \times 10^{-7}$ М Fe^{2+} ; $1,4 \times 10^{-5}$ М H_2O_2 ; $3,16 \times 10^{-3}$ М дофаміну.

На першому етапі зареєстровано спектри оптичного поглинання під час реакції окиснення дофаміну в модельній хімічній системі (рис. 1).

Згідно з графічними даними можна спостерігати утворення проміжних продуктів окиснення дофаміну (переважно дофамінохрому) з максимумом оптичного поглинання при довжині хвилі 500 нм. Зроблено висновок, що при цій довжині хвилі й потрібно проводити вимірювання. Температура проведення дослідження була обрана 37 °С як фізіологічна температура тіла людини.

Установлено, що в запропонованій модельній хімічній системі дофамін окиснюється до дофамінохрому протягом 10 хв. Після цього починає утворюватися кінцевий продукт реакції – нейромеланін – біополімер, що становить чорний осад [12], який заважає спектрофотометричному вимірюванню.

З метою отримання документованого підтвердження того, що розроблена спектрофотометрична методика визначення кінетики окиснення дофаміну дає змогу з високим ступенем надійності отримувати достовірні відомості про

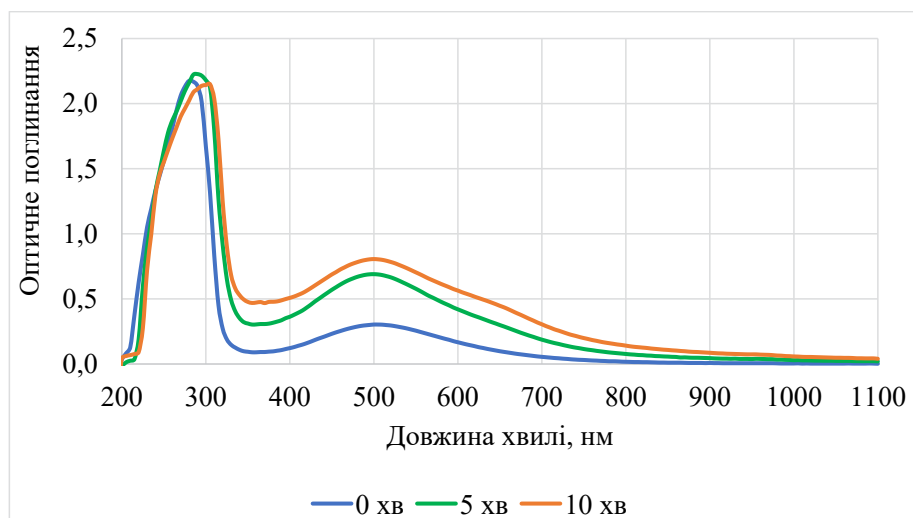


Рис. 1. Спектри оптичного поглинання під час реакції окиснення дофаміну на початку реакції (0 хв), через 5 та 10 хв

якісний і кількісний склад випробовуваних проб, було проведено валідацію аналітичної методики за такими параметрами: специфічність, лінійність, прецизійність та робастність.

Методи дослідження.

Реактиви та обладнання. При проведенні експериментальних досліджень використовували такі реактиви: 40 мг/мл розчин дофаміну гідрохлориду (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна), гліцин (High Hope Int'l Group Jiangsu Champion Holdings Ltd., Китай), натрію гідроксид дрібногранульований (Merck, Німеччина), розчин пероксиду водню 60 % (ТОВ «Інтер-Синтез», Україна), феруму (II) сульфат гептагідрат (АТ «Макрохім», Україна), вода очищена.

У процесі досліджень застосовували таке обладнання та допоміжні матеріали: ваги аналітичні AS 60/220. R2 (Radwag, Польща); лабораторну установку водопідготовки RO-4 (Werner, Німеччина); пробірки типу Eppendorf об'ємом 2 мл; УФ-спектрофотометр OPTIZEN POP (Mecasys, Південна Корея); кювети з кварцового скла з товщиною оптичного шару 1 см (Agilent, США); термостат для кювет DB-10C (Biosan, Латвія); одноканальні напівавтоматичні дозатори об'ємами 50, 200, 1000 мкл (Dragon-Lab, Китай); таймер; лабораторний посуд.

Приготування 0,8 М гліцин-NaOH буферного розчину (pH 9,5). Буферний розчин готували з 0,2 М розчину гліцину та 0,2 М розчину NaOH. У мірну колбу на 500 мл додавали 125 мл 0,2 М розчину гліцину та 42 мл 0,2 М розчину NaOH, перемішували й доводили водою очищеною до мітки.

Приготування 1,4 М розчину H₂O₂. 80 мкл H₂O₂ (60 %) доводили водою очищеною до 1 мл.

Приготування 0,032 М розчину Fe²⁺. 0,009 г FeSO₄*7H₂O розчиняли в 1 мл води очищеної.

Проведення вимірювання контрольної проби. У кварцову кювету з товщиною оптичного шару 1 см послідовно вносили таку кількість речовин, щоразу швидко перемішуючи вміст після додавання: 1930 мкл 0,8 М гліцин-NaOH буферного розчину; 20 мкл 1,4 М розчину H₂O₂; 20 мкл 0,032 М розчину Fe²⁺; 30 мкл 40 мг/мл розчину дофаміну гідрохлориду та проводили вимірювання за такими параметрами: довжина хвилі – 500 нм; температура – 37,0±0,1°C; інтервал – 10 с; час вимірювання – 10 хв.

Як розчин порівняння використовували розчин окиснювальної системи (0,8 М гліцин-NaOH буферний розчин; 1,4 М розчин H₂O₂; 0,032 М розчину Fe²⁺). Виміри повторювали тричі.

Визначення швидкості окиснення дофаміну. Швидкість окиснення дофаміну встановлювали за допомогою обчислення константи швидкості реакції першого порядку K_H^1 (формула 1) лінійної ділянки кінетичної кривої (240–480 с).

$$K_H^1 = \frac{1}{t} * \ln \frac{D_\infty - D_0}{D_\infty - D_t}, \quad (1)$$

де t – час реакції;

D_∞ – значення оптичної густини після закінчення реакції;

D_0 – значення оптичної густини на початку реакції;

D_t – значення оптичної густини в певний момент часу.

Валідаційні характеристики методики. Для валідації запропонованої спектрофотометричної методики визначення швидкості окиснення дофа-

міну експериментально досліджували такі характеристики: специфічність, лінійність, прецизійність та робастність.

Процедура валідації відповідає рекомендаціям настанов з валідації аналітичних методик: Державної фармакопеї України [13]; ICH Q2A (Validation of analytical methods: definition and terminology) [14]; ICH Q2B (Guideline on validation of analytical procedures: Methodology) [15].

Статистична обробка даних. Статистичні розрахунки виконували в програмному забезпеченні Microsoft Excel. При статистичному аналізі матеріалу виконували розрахунок інтенсивних й екстенсивних показників середніх величин, визначали достовірність відмінностей середніх та відносних величин по t-критерію Стьюдента. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження. У процесі процедури валідації запропонованої спектрофотометричної методики визначення швидкості окиснення дофаміну визначено такі параметри: специфічність, лінійність, прецизійність та робастність.

Специфічність. Специфічність – здатність аналітичної методики забезпечити отримання точного значення кількісного вмісту аналізованої речовини за наявності інших компонентів.

Розроблена методика заснована на визначенні кількісного вмісту утворюваних продуктів реакції окиснення дофаміну, переважно дофамінохромом, за довжини хвилі 500 нм.

Для валідації методики за параметром «Специфічність» записували спектри розчинів усіх речо-

вин, які утворюють реакційну систему. Результати представлені на рисунку 2.

Аналізуючи спектри, можна стверджувати, що максимума поглинання для інших сполук, які містяться в системі за заданої довжини хвилі, відсутні, отже, довжина хвилі детектора 500 нм специфічна для аналізу.

Лінійність. Лінійністю спектрофотометричної методики є її здатність забезпечити пряму пропорційність між сигналом детектора (оптичним поглинанням) й концентрацією (в цій ділянці) аналізованого компонента в розчині.

У цій методиці аналізована речовина – це продукти окиснення дофаміну, переважно дофамінохром, який, за літературними даними, утворюється зі стехіометрією 1:1 [8], отже, концентрація утворюваної аналізованої речовини відповідає концентрації субстрату, тому варіацію концентраційних рівнів можна здійснити на рівні дофаміну.

Для валідації розробленої методики за параметром «Лінійність» зареєстровано оптичне поглинання в останній вимірюваній точці (10 хв) розчинів, що містять дофамін у концентраціях (мкг/мл): 480; 540; 600; 660 і 720, тобто на концентраційних рівнях (%): 80; 90; 100; 110 і 120 від номінальної концентрації.

Вимірювання та приготування розчинів відбувалося відповідно до розробленої методики, окрім об'ємів розчину дофаміну та буферного розчину. Схему приготування та використовувани об'єми цих розчинів наведено в таблиці 1. Зміни об'єму розчину дофаміну в пробах компенсували

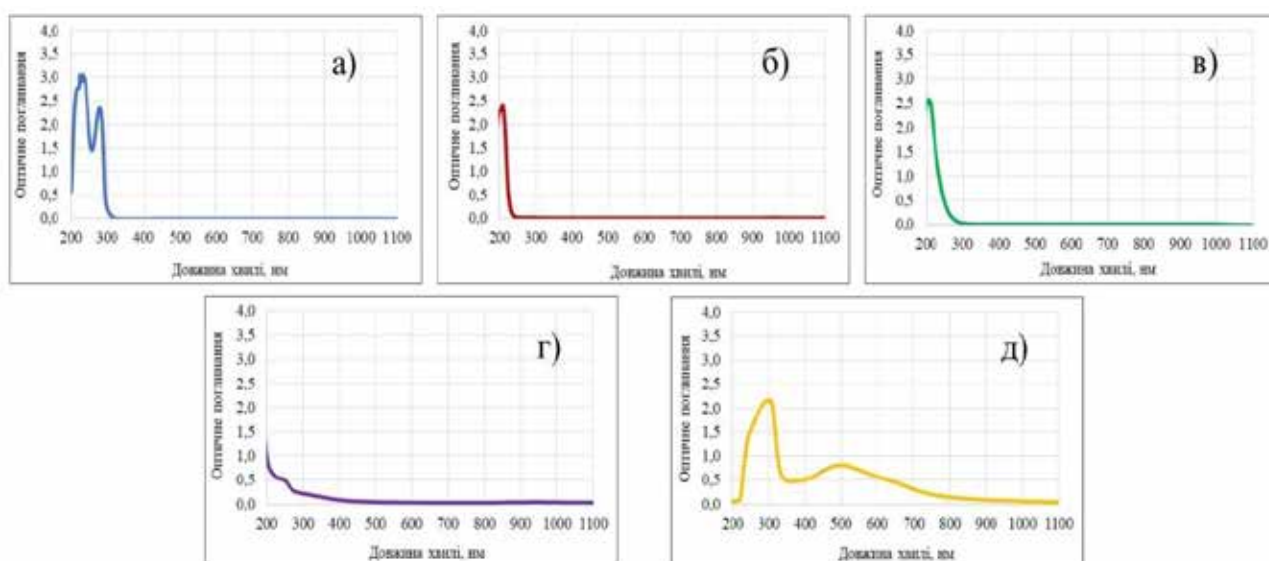


Рис. 2. Спектри оптичного поглинання: а) розчину дофаміну; б) 0,8 М гліцин-NaOH буферного розчину; в) 0,014 М розчину H_2O_2 ; г) 0,032 М розчину $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; д) продуктів реакції окиснення дофаміну (дофамінохрому)

Таблиця 1

Приготування розчинів для визначення лінійності методики

№	Концентраційний рівень, %	Концентрація, мкг/мл	Об'єм 40 мг/мл розчину дофаміну, мкл	Об'єм 0,8 М гліцин-NaOH буферного розчину, мкл
1	80	480	24	1936
2	90	540	27	1933
3	100	600	30	1930
4	110	660	33	1927
5	120	720	36	1924

Таблиця 2

Результати випробування за параметром «Лінійність»

Конц. рівень, %	Оптичне поглинання						За рівнянням регресії		
	Вимір № 1	Вимір № 2	Вимір № 3	Сер.	Відх.	%	Знач.	Відх.	%
80	0,723	0,722	0,723	0,7227	0,0006	0,08	0,724	0,0006	0,08
90	0,740	0,739	0,741	0,7400	0,0010	0,14	0,738	0,0015	0,20
100	0,752	0,752	0,752	0,7520	0,0000	0,00	0,752	0,0002	0,03
110	0,765	0,765	0,764	0,7647	0,0006	0,08	0,767	0,0015	0,19
120	0,783	0,782	0,782	0,7823	0,0006	0,07	0,781	0,0008	0,11
Сума квадратів відхилень							0,00000542		
Залишкове стандартне відхилення							0,00116		

буферним розчином. На кожному концентраційному рівні проводили по три вимірювання.

Результати випробування за параметром «Лінійність» представлено в таблиці 2.

Було побудовано графік у координатах концентраційний рівень дофаміну (%) – оптичне поглинання (рис. 3) та знайдено коефіцієнт рівняння лінійної регресії, коефіцієнт кореляції, залишкове стандартне відхилення.

Коефіцієнти кореляційного рівняння лінійної регресії обчислюються автоматично за допомогою Microsoft Excel. Залишкове стандартне відхилення S_0 обчислювали за формулою 2:

$$S_0 = \sqrt{\sum / (N - 1)}, \quad (2)$$

де \sum – сума квадратів відхилень від рівняння регресії;

N – кількість точок лінії регресії.

Отже, коефіцієнт кореляції в інтервалі концентрацій дофаміну 80–120 % становить 0,995, який більш ніж 0,99, що підтверджує лінійність методики.

Прецизійність. Прецизійність аналітичної методики виражається ступенем розсіювання значень вимірюваної величини, отриманих при вимірюваннях на декількох пробах одного й того ж однорідного зразка в одних умовах, навколо центру групування (середнього арифметичного).

Прецизійність повинна бути визначена на двох рівнях: збіжність і відтворюваність.

Збіжність визначається як міра прецизійності при вимірах в одних умовах за короткий проміжок часу.

Для валідації методики за пунктом «прецизійність – збіжність» відповідно до валідованої методики проводили 12 повторних вимірів оптичного поглинання в останній вимірюваній точці (10 хв) та заповнювали таблицю Microsoft Excel, де обчислювали середнє значення, значення стандартного відхилення й довірчого інтервалу (табл. 3).

Відтворюваність методики визначається як внутрішньолабораторна збіжність, тобто вся процедура, описана для «збіжності», виконується через день, іншим оператором (аналітик 2). Після цього обчислюється відтворюваність методики як довірчий інтервал середніх вимірів першого й другого аналітиків.

Для збіжності методики довірчий інтервал становить 0,22 % (<0,5 %), для відтворюваності – 0,73 % (<1,0 %), отже, прецизійність методики підтверджено.

Робастність. Робастність аналітичної методики визначається її здатністю не реагувати на вплив невеликих, але навмисних змін параметрів методики і є показником надійності методики при використанні в нормальних умовах.

Для валідації методики за параметром «Робастність» оцінено вплив зміни температури проведення дослідження та довжини хвилі детектора,

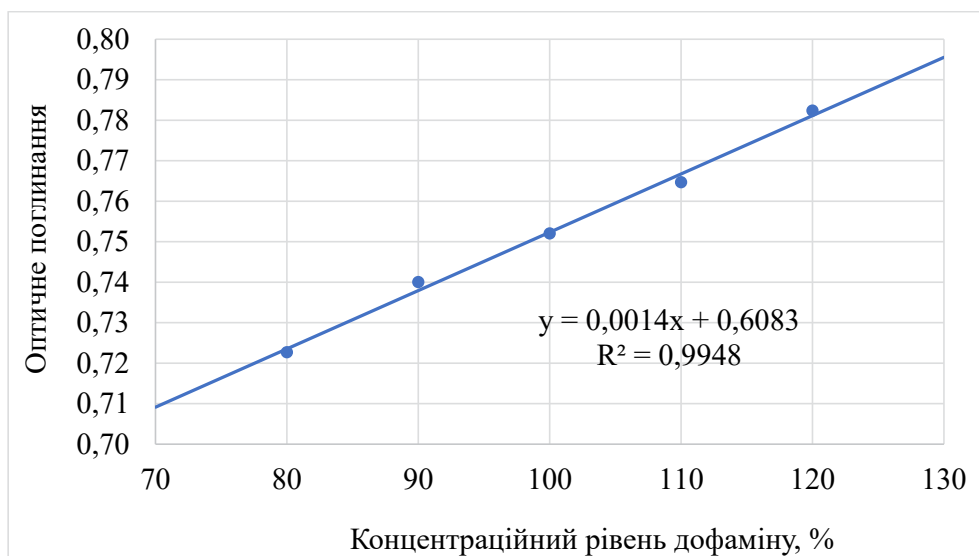


Рис. 3. Графік лінійності валідованої методики

Таблиця 3

Результати випробування за параметром «Прецизійність»

№ виміру	Аналітик 1	Аналітик 2
Вимір 1	0,754	0,749
Вимір 2	0,752	0,750
Вимір 3	0,756	0,749
Вимір 4	0,755	0,748
Вимір 5	0,756	0,750
Вимір 6	0,754	0,748
Вимір 7	0,753	0,750
Вимір 8	0,752	0,750
Вимір 9	0,755	0,751
Вимір 10	0,755	0,749
Вимір 11	0,754	0,740
Вимір 12	0,755	0,750
Середнє значення	0,7543	0,7487
Стандартне відхилення	0,0014	0,0029
Стандартне відхилення, %	0,18	0,38
Довірчий інтервал	0,10	0,22
Відтворюваність, довірчий інтервал, %	0,73	

Таблиця 4

Залежність оптичного поглинання від температури

Температура, °C	Вимір № 1	Вимір № 2	Вимір № 3	Середнє значення	Стандартне відхилення	Стандартне відхилення, %
35	0,752	0,750	0,751	0,751	0,001	0,13
37	0,753	0,753	0,752	0,753	0,001	0,08
39	0,753	0,754	0,754	0,754	0,001	0,08
Загальне				0,752	0,001	0,18

адже обидва ці параметри можуть впливати на прецизійність методики.

Вимірювання та приготування розчинів здійснювали відповідно до розробленої методики.

Для визначення впливу температури проведення дослідження записували оптичне поглинання в кінці реакції (10 хв) тричі при температурі, °C: 35; 37; 39 (таблиця 4).

Таблиця 5

Залежність оптичного поглинання від довжини хвилі

Довжина хвилі, нм	Вимір № 1	Вимір № 2	Вимір № 3	Середнє значення	Стандартне відхилення	Стандартне відхилення, %
498	0,751	0,750	0,750	0,750	0,001	0,08
500	0,753	0,753	0,754	0,753	0,001	0,08
502	0,750	0,751	0,751	0,751	0,001	0,08
Загальне				0,751	0,002	0,22

Таблиця 6

Загальні результати валідації спектрофотометричної методики визначення швидкості окиснення дофаміну в хімічній модельній системі

№	Параметр	Критерій прийнятності	Результати валідації
Кількісне визначення			
1	Специфічність	Довжина хвилі детектора має бути специфічною виключно для аналізу.	Відповідає
2	Лінійність	Коефіцієнт кореляції в інтервалі концентрацій 80–120% не менш ніж 0,99.	0,995
3	Прецизійність:		
	• збіжність	довірчий інтервал Δ не більш ніж 0,5 %;	0,22%
	• відтворюваність	довірчий інтервал Δ не більш ніж 1,0 %.	0,73%
Загальні параметри			
4	Робастність	Визначити вплив факторів: • температура кювети; • довжина хвилі детектора.	Відповідає

Для визначення впливу довжини хвилі детектора записували оптичне поглинання в кінці реакції (10 хв) тричі при довжинах хвилі, нм: 498; 500; 502 (таблиця 5).

Стандартне відхилення при зміні температури на $\pm 2^\circ\text{C}$ становить 0,18 %, а при відхиленні довжини хвилі на ± 2 нм – 0,22 %, що є менше ніж 1,0 %, отже, робастність підтверджено.

Загальні висновки валідації. За отриманими результатами процедури валідації доведено, що розроблена методика дає змогу отримувати правильні й відтворювані результати визначення швидкості окиснення дофаміну. Загальні результати валідації запропонованої методики представлено в таблиці 6.

Висновки. У результаті проведеного дослідження розроблено та валідовано спектрофотометричну методику визначення швидкості

окиснення дофаміну. Проведено валідацію розробленої методики за параметрами: специфічність, лінійність, прецизійність та робастність системи. Доведено, що всі обрані валідаційні характеристики розробленої методики відповідають критеріям прийнятності, що підтверджує валідність методики.

Ця методика визначення швидкості окиснення дофаміну дає змогу досить швидко та точно визначати кінетику перебігу цього процесу. Вона може застосовуватися для дослідження впливу різних активних фармацевтичних інгредієнтів на процес окиснення дофаміну, що сприятиме розробці нових лікарських засобів, спрямованих на підтримання оптимального рівня дофаміну й збереження його функціональності, які, відповідно, можуть використовуватися для лікування та профілактики хвороби Паркінсона.

ЛІТЕРАТУРА

- Chhetri J. K., Mei S., Wang C., Chan P. New horizons in Parkinson's disease in older populations. Age and ageing. 2023. № 52(10). afad186. <https://doi.org/10.1093/ageing/afad186>
- Tolosa E., Garrido A., Scholz S. W., Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. The Lancet. Neurology. 2021. № 20(5). P. 385–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)
- Saramowicz K., Siwecka N., Galita G., Kucharska-Lusina A., Rozpedek-Kamińska W., Majsterek I. Alpha-Synuclein Contribution to Neuronal and Glial Damage in Parkinson's Disease. International journal of molecular sciences. 2023. № 25(1). P. 360. <https://doi.org/10.3390/ijms25010360>

4. Klein M. O., Battagello D. S., Cardoso A. R., Hauser D. N., Bittencourt J. C., Correa R. G. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and molecular neurobiology*. 2019. № 39(1). P. 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>
5. Zhou Z. D., Yi L. X., Wang D. Q., Lim T. M., Tan E. K. Role of dopamine in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Translational neurodegeneration*. 2023. № 12(1). 44. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00378-6>
6. Dias V., Junn E., Mouradian M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*. 2013. № 3(4). P. 461–491. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
7. Segura-Aguilar J., Paris I., Muñoz P., Ferrari E., Zecca L., Zucca F. A. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 2014. № 129(6). P. 898–915. <https://doi.org/10.1111/jnc.12686>
8. Pham A. N., Waite T. D. Cu(II)-catalyzed oxidation of dopamine in aqueous solutions: mechanism and kinetics. *Journal of inorganic biochemistry*. 2014. № 137. P. 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.03.018>
9. Sun Y., Pham A. N., Hare D. J., Waite T. D. Kinetic Modeling of pH-Dependent Oxidation of Dopamine by Iron and Its Relevance to Parkinson's Disease. *Front Neurosci*. 2018. № 12. P. 859. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00859>
10. Florence T. M., Stauber J. L. Manganese catalysis of dopamine oxidation. *The Science of the total environment*. 1989. № 78. P. 233–240. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(89\)90036-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(89)90036-3)
11. Klegeris A., Korkina L. G., Greenfield S. A. Autoxidation of dopamine: a comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. *Free radical biology & medicine*. 1995. № 18(2). P. 215–222. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00141-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00141-6)
12. Vila M. Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 2019. № 34(10). P. 1440–1451. <https://doi.org/10.1002/mds.27776>
13. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. 2015. № 2. P. 910–929.
14. European Medicines Agency. ICH Q2A: Validation of analytical methods: definition and terminology. London, Canary Wharf. 1995.
15. European Medicines Agency. ICH Q2B: Guideline on validation of analytical procedures: Methodology. London, Canary Wharf. 1997.

REFERENCES

1. Chhetri, J. K., Mei, S., Wang, C., & Chan, P. (2023). New horizons in Parkinson's disease in older populations. *Age and ageing*, 52(10), afad186. <https://doi.org/10.1093/ageing/afad186>
2. Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 20(5), 385–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)
3. Saramowicz, K., Siwecka, N., Galita, G., Kucharska-Lusina, A., Rozpedek-Kamińska, W., & Majsterek, I. (2023). Alpha-Synuclein Contribution to Neuronal and Glial Damage in Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, 25(1), 360. <https://doi.org/10.3390/ijms25010360>
4. Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and molecular neurobiology*, 39(1), 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>
5. Zhou, Z. D., Yi, L. X., Wang, D. Q., Lim, T. M., & Tan, E. K. (2023). Role of dopamine in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Translational neurodegeneration*, 12(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00378-6>
6. Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 3(4), 461–491. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
7. Segura-Aguilar, J., Paris, I., Muñoz, P., Ferrari, E., Zecca, L., & Zucca, F. A. (2014). Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 129(6), 898–915. <https://doi.org/10.1111/jnc.12686>
8. Pham, A. N., & Waite, T. D. (2014). Cu(II)-catalyzed oxidation of dopamine in aqueous solutions: mechanism and kinetics. *Journal of inorganic biochemistry*, 137, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.03.018>
9. Sun, Y., Pham, A. N., Hare, D. J., & Waite, T. D. (2018). Kinetic Modeling of pH-Dependent Oxidation of Dopamine by Iron and Its Relevance to Parkinson's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 12, 859. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00859>
10. Florence, T. M., & Stauber, J. L. (1989). Manganese catalysis of dopamine oxidation. *The Science of the total environment*, 78, 233–240. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(89\)90036-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(89)90036-3)
11. Klegeris, A., Korkina, L. G., & Greenfield, S. A. (1995). Autoxidation of dopamine: a comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. *Free radical biology & medicine*, 18(2), 215–222. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00141-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00141-6)
12. Vila M. (2019). Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 34(10), 1440–1451. <https://doi.org/10.1002/mds.27776>
13. State enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products» (2015). Validation of analytical methods and tests. *State Pharmacopoeia of Ukraine*, 2, 910–929 [In Ukrainian].
14. European Medicines Agency (1995). ICH Q2A: Validation of analytical methods: definition and terminology. London, Canary Wharf.
15. European Medicines Agency (1997). ICH Q2B: Guideline on validation of analytical procedures: Methodology. London, Canary Wharf.