

УДК 543.426:543.862

ФОСФОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТНЫХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

Е.М. Рехарская, А.П. Чухаркина, Т.В. Поленова, А.Г. Борзенко

(кафедра аналитической химии; e-mail: polenova@analyt.chem.msu.ru)

Изучена возможность количественного определения празозина, пиндолола и фолиевой кислоты в ряде лекарственных препаратов на основе регистрации интенсивности фосфоресценции при комнатной температуре в мицеллярных средах. Предложены методики для их определения.

Гетероциклические соединения играют одну из ключевых ролей в процессах жизнедеятельности организма. Благодаря высокой биологической активности гетероциклов они широко применяются в медицине для лечения различных заболеваний: инфекционных, сердечно-сосудистых, раковых и т.д. По некоторым данным более 60% наиболее широко применяемых синтетических препаратов являются гетероциклическими соединениями [1]. К ним, в частности, относятся празозин, пиндолол и фолиевая кислота (табл. 1).

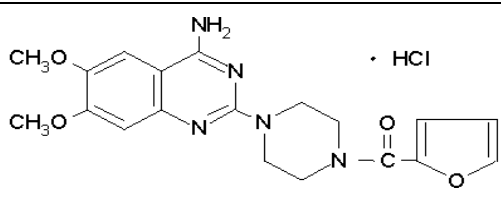
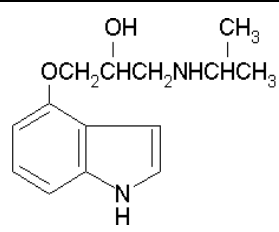
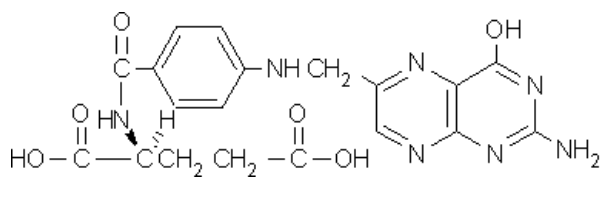
Празозин (ПРАЗ) является гипотензивным α -адреноблокирующим препаратом, применяемым при гипертонической болезни и сердечной недостаточности.

Пиндолол (ПИН) оказывает антиангинальное, антиаритмическое и гипотензивное действие. Фолиевая кислота (ФОЛ) применяется при лечении лекарственной и радиационной анемии и лейкопении [2].

По данным Фармакопеи США для идентификации ПРАЗ, ПИН и ФОЛ используют методы молекулярной оптической спектроскопии, ВЭЖХ, а так-

Таблица 1

Структурные формулы и спектрально-люминесцентные характеристики ПРАЗ, ПИН и ФОЛ

Соединение	Структурная формула	$\lambda_{\text{возб.}}$, нм	$\lambda_{\text{фл.}}$, нм	$\lambda_{\text{фос.}}$, нм
ПРАЗ		270, <u>341</u>	390	505
ПИН		240, <u>292</u>	308, 318	495
ФОЛ		<u>270</u> , 333	365, 444	530

же тест-методы. Для количественного определения этих соединений применяют титрование (чистые субстанции) и ВЭЖХ (препараты) [3]. Весьма перспективным, на наш взгляд, представляется изучение спектров флуоресценции при комнатной температуре (ФКТ) для идентификации и количественного определения активных компонентов лекарственных препаратов, так как спектры флуоресценции во многом более характеристичны, чем УФ-спектры и времена удерживания в ВЭЖХ.

В ряде работ изучали ФКТ для некоторых азотных гетероциклических соединений. Например, в нескольких фармацевтических препаратах проводили фосфориметрическое определение дипиридамола в мицеллярных средах [4], а также определение индометацина на твердых подложках [5]. Аналогичным образом был изучен ряд азотных гетероциклов, не являющихся лекарственными препаратами [6]. Изучение ПРАЗ, ПИН и ФОЛ методом ФКТ ранее не проводили.

Цель данной работы состояла в изучении возможности количественного определения ПРАЗ, ПИН и ФОЛ в ряде лекарственных препаратов методом ФКТ в мицеллярных средах.

Экспериментальная часть

Реактивы. В работе использовали празозина гидрохлорид, пиндолол (*Wako*, Япония), фолиевую кислоту (*Sigma*, США), сульфит натрия, нитрат таллия, додецилсульфат натрия (ДСН) (*Acros*, Германия). Растворы сульфита готовили непосредственно перед измерением. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду.

Лекарственные препараты. В работе использовали следующие лекарственные препараты: Празозин («Нортон Хэлскэа ЛТД», Великобритания), Виске («Эгис», Венгрия), Вискальдикс («Эгис», Венгрия), Кислота фолиевая (ОАО «Щелковский витаминный завод», Россия), Центрум («Ледерле лабораториз дивижн американ цианамид компани», США).

Аппаратура. Спектры флуоресценции мицеллярных растворов измеряли на спектрофлуориметре «Панорама» («Люмэкс», Россия). Для измерения использовали кварцевые кюветы ($l = 1$ см)

Хроматографические исследования проводили на жидкостном хроматографе «Shimadzu LC-10AT» (Япония) с УФ-детектором. В работе использовали стальную колонку Mightysil RP-18 размером 150×4,6 (5 μ).

Приготовление растворов

Методика 1. В колбу емкостью 10 мл помещали по 0,1 мл изучаемого соединения с концентрацией $3,0 \cdot 10^{-4}$ М (ПРАЗ, ФОЛ или ПИН), 2,5 мл 0,1 М раствора ДСН, 0,6 мл 0,25 М раствора TiNO_3 , 0,5 мл 0,1 М раствора сульфита натрия и доводили до метки водой. Колбу с полученным раствором помещали на 5 мин в ультразвуковую ванну (УЗВ) при $t = 30\text{--}35^\circ\text{C}$. После ультразвуковой обработки растворы выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин, затем производили измерения.

Методика 2. Таблетку лекарственного препарата взвешивали, после чего тщательно растирали в агатовой ступке. В каждом случае брали такую часть препарата, чтобы конечная концентрация в рабочем растворе составила $3,0 \cdot 10^{-4}$ М. Исходный раствор помещали в УЗВ для полного растворения определяемого компонента, после чего раствор отфильтровывали с использованием бумажного фильтра марки «синяя лента». Далее следовали методике 1.

Результаты и обсуждение

Анализ спектров флуоресценции. Жесткая структура некоторых азотных гетероциклов позволяет при комнатной температуре получать хорошо разрешенные электронно-колебательные спектры флуоресценции. Для генерации аналитического сигнала флуоресценции при комнатной температуре требуются наличие организованной среды и тяжелого атома, а также отсутствие молекулярного кислорода [7]. Возможность получения спектров флуоресценции в таких условиях определяется во многом характеристиками используемых приборов. Для наблюдения спектра флуоресценции изучаемых соединений необходимо использовать прибор с временным разрешением сигналов, поскольку интенсивность сигналов флуоресценции азотных гетероциклов довольно низкая.

При анализе спектральных данных использовали трехмерное представление флуоресцентных характеристик, получившее в англоязычной литературе название emission-excitation spectra (EES) или emission-excitation matrix (EEM). Этому названию соответствует термин «спектры возбуждения-эмиссии (ВЭ)». Такой способ представления данных содержит в себе максимальное количество информации о люминофоре, включая абсорбционные и эмиссионные характеристики, знание которых необ-

ходимо для идентификации изучаемого компонента в сложных смесях.

Спектры ВЭ фосфоресценции мицеллярных растворов ПРАЗ, ПИН и ФОЛ представлены на рис. 1. Спектры были получены при следующих условиях сканирования: ширина щели монохроматоров 14 нм, время задержки измерения строба 40 мкс, время длительности измерения строба 1000 мкс, скорость сканирования 3 нм/с. Спектры фосфоресценции ПРАЗ, ПИН и ФОЛ характеризуются широкими полосами с максимумами при длинах волн 495, 505 и 530 нм соответственно. Следует отметить, что данные спектры были сняты при разных концентрациях: $3 \cdot 10^{-5}$ М (ПИН) и $3 \cdot 10^{-6}$ М (ПРАЗ и ФОЛ).

Оптимизация условий ФКТ определения

Влияние pH на интенсивность сигнала ФКТ.

Принимая во внимание химическую природу исследуемых соединений, можно предположить, что форма нахождения исследуемого соединения в растворе и, следовательно, спектральные характеристики во многом будут определяться величиной кислотности раствора. Зависимость интенсивности ФКТ-сигнала от величины pH раствора представлена на рис. 2. Анализ приведенных данных свидетельствует о существовании оптимальной области значений pH, в которой интенсивность ФКТ-сигнала максимальна. Эти оптимальные значения находятся в диапазоне 8–9 ед. pH, причем ширина этой области зависит от конкретного соединения.

Влияние тяжелого атома и ДСН на интенсивность сигнала ФКТ. Для увеличения квантового выхода фосфоресценции в мицеллярных средах классическим реагентом является нитрат таллия. На рис. 3 представлены зависимости интенсивности фосфоресцентного сигнала от различных концентраций нитрата таллия. Как следует из представленных данных, с увеличением концентрации нитрата таллия интенсивность сигнала ФКТ проходит через максимум. Для низких концентраций таллия интенсивность сигнала ФКТ оказывается невелика на фоне сильного флуоресцентного сигнала, затрудняющего измерение ФКТ. Увеличение концентрации таллия приводит к тушению флуоресценции и увеличению интенсивности ФКТ. Такое влияние является результатом проявления нескольких процессов: увеличения скорости интеркомбинационной конверсии из возбужденного синглетного в триплетное состояние S_1-T_1 и увеличение вероятнос-

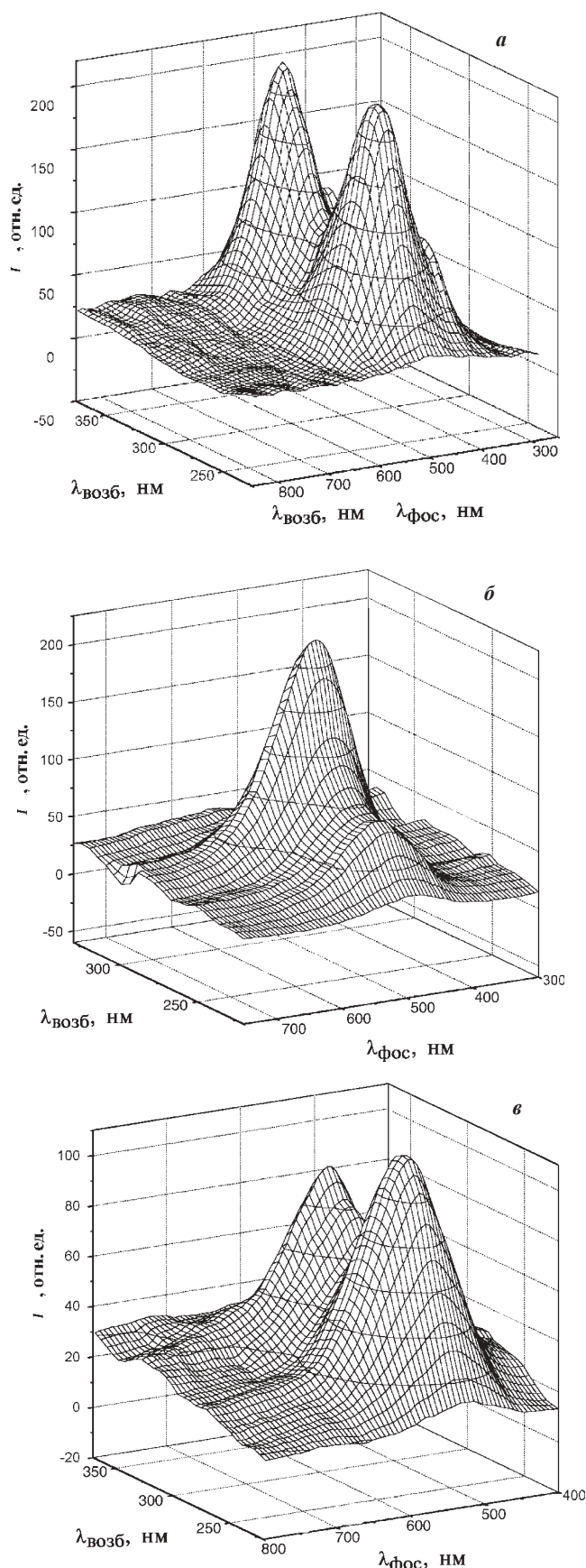


Рис. 1. Спектры ВЭ фосфоресценции мицеллярных растворов празозина, пиндола и фолиевой кислоты: а – ПРАЗ, б – ПИН, в – ФОЛ

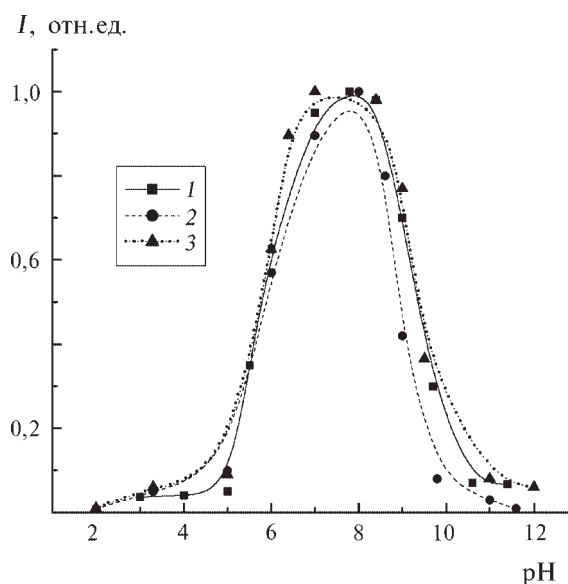


Рис. 2. Зависимость интенсивности ФКТ сигнала от pH: 1 – ПРАЗ, 2 – ПИН, 3 – ФОЛ

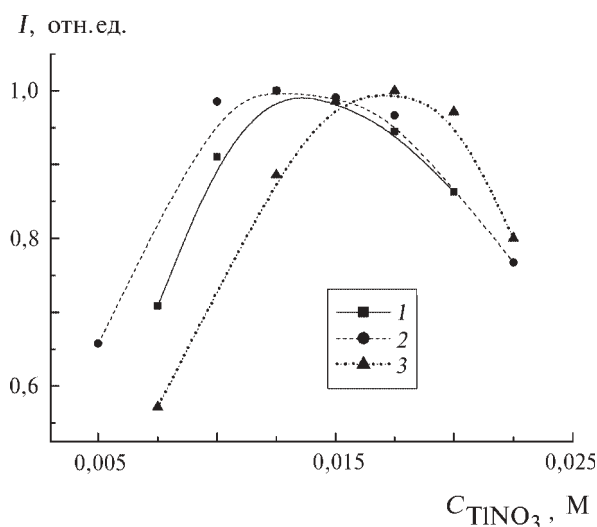


Рис. 3. Зависимость интенсивности ФКТ сигнала от концентрации нитрата таллия: 1 – ПРАЗ, 2 – ПИН, 3 – ФОЛ

ти излучательных переходов из триплетного состояния в синглетное основное. Однако дальнейшее увеличение концентрации таллия в растворе приводит к образованию осадка (очевидно, додецилсульфата таллия) и уменьшению интенсивности сигнала ФКТ. В дальнейшем для получения единой методики использовали концентрацию $1,5 \cdot 10^{-2}$ М.

В качестве организованной среды часто используют различные поверхностно-активные вещества (ПАВ). Результаты изучения влияния концентрации ДСН на интенсивность сигнала ФКТ исследуемых соединений представлены на рис. 4. Как видно из рисунка, в том случае, если концентрация ДСН ниже критической концентрации

мицеллообразования, сигнал ФКТ крайне мал или вообще не регистрируется. Наибольшая интенсивность ФКТ наблюдается при концентрации ДСН $2,5 \cdot 10^{-2} - 3,0 \cdot 10^{-2}$ М. Необходимо отметить тот факт, что в связи с ограниченной растворимостью додецилсульфата таллия, оптимальное соотношение равновесных концентраций $[ДСН]:[Ti]$ составляет 1,6. Такое соотношение поддерживалось во всех последующих экспериментах. По-видимому, снижение интенсивности ФКТ при высоких концентрациях ДСН можно объяснять выпадением осадка додецилсульфата таллия, а также структурной перестройкой образующихся мицелл.

В литературе приведены примеры по использованию в качестве мицеллообразующих агентов кроме анионных ПАВ, классическим представителем которых является додецилсульфат натрия, и других типов ПАВ – катионных и неионогенных. В настоящей работе была сделана попытка оценить эффективность последних для усиления сигнала ФКТ.

В качестве неионогенного ПАВ использовали Тритон Х-100, однако удовлетворительных результатов получить не удалось. Для всех исследованных соединений сигнал ФКТ существенно ниже сигнала, регистрируемого в системах с ДСН. Кроме того, установление концентрации Тритон Х-100 выше критической концентрации мицеллообразования приводит к полному исчезновению сигнала

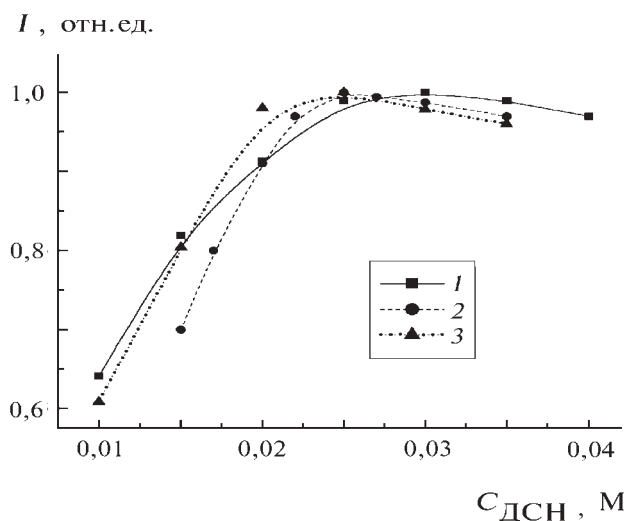


Рис. 4. Зависимость интенсивности ФКТ сигнала от концентрации додецилсульфата натрия: 1 – ПРАЗ, 2 – ПИН, 3 – ФОЛ

ФКТ. Аналогичная ситуация наблюдалась при использовании катионного ПАВ – бромида триметилцетиламмония.

Известно, что для некоторых соединений использование смешанных мицелл (например, ДСН и Тритон-Х) позволяет увеличить чувствительность ФКТ-метода [8]. Однако, как показали наши эксперименты, ощутимое увеличение интенсивности ФКТ-сигнала нам удалось получить лишь для ПИН, поэтому в качестве организованной среды использовали ДСН.

Определение ПРАЗ, ФОЛ и ПИН в лекарственных препаратах. В работе изучали препараты, представленные на российском рынке. Фармацевтические формы пиндолола содержатся в препаратах «Вискен» и «Вискальдикс». Под названием «Вискальдикс» выпускаются таблетки, содержащие по 10 мг пиндолола и 5 мг диуретического препарата клопамид. «Вискен» содержит только определяемый компонент. Празозин является единственным активным компонентом в фармацевтическом препарате «Празозин». Фолиевая кислота содержится в различных препаратах, и как единственный активный компонент и в комбинации с другими соединениями, например, в препаратах витаминов.

На основании выбранных ранее условий были получены градуировочные зависимости для определяемых соединений. Метрологические характеристики представлены в табл. 2. Непосредственное определение исследуемого компонента в лекарственных препаратах проводили, следуя методике 2 (см. раздел приготовление растворов). Результаты, полученные при определении активных компонен-

тов в фармацевтических препаратах, представлены в табл. 3. Анализ данных, полученных при определении ПРАЗ и ПИН во всех изучаемых препаратах, свидетельствует о хорошем согласии результатов. Необходимо отметить, что определению ПИН в комбинированном препарате «Вискальдикс» не мешает наличие другого компонента – клопамид. В случае определения ФОЛ в препарате, содержащем только этот компонент, относительная погрешность составила 2%. Однако в витаминно-минеральном комплексном препарате «Центрум» этот компонент определить не удалось. Этот факт связан с тем, что указанный препарат в качестве других активных компонентов содержит флуоресцирующие и фосфоресцирующие соединения. По-видимому, для витаминно-минеральных комплексов требуется разработка более сложной методики с использованием временной селекции сигналов фосфоресценции присутствующих компонентов.

Правильность полученных результатов по определению активного компонента в коммерческих препаратах подтверждали методом ВЭЖХ. В работе использовали стандартные ВЭЖХ-методики определения данных препаратов [3]. Получено хорошее соответствие результатов обоих методов.

Представленные в работе результаты свидетельствуют о том, что методика, основанная на измерении фосфоресценции при комнатной температуре в мицеллярных средах, позволяет определять содержание ПРАЗ, ПИН, ФОЛ в разных лекарственных препаратах. Однако определение ФОЛ в витаминно-минеральных комплексах требует дальнейшего изучения.

Таблица 2

Метрологические характеристики определения ПРАЗ, ПИН и ФОЛ

Соединение	Диапазон линейности, М	Коэффициент корреляции	Предел обнаружения, М
ПРАЗ	$5 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-5}$	0,998	$3,0 \cdot 10^{-7}$
ПИН	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	0,984	$8,7 \cdot 10^{-7}$
ФОЛ	$6 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-5}$	0,997	$4,1 \cdot 10^{-7}$

Определение ПРАЗ, ПИН и ФОЛ в лекарственных препаратах методом ФКТ и ВЭЖХ ($n = 3, P = 0,95$)

Препарат	Содержание активных компонентов в одной таблетке	Найдено определяемого компонента, %	
		ФКТ, %	ВЭЖХ, %
Празозин	празозин, 0,5 мг	98,5 ± 0,4	98,0 ± 1,0
Вискен	пиндолол, 5 мг	98,9±0,3	99,0 ± 1,0
Вискальдиск	пиндолол, 10 мг клопамид, 5 мг	98,0 ± 1,0	96,0 ± 1,0
Кислота фолиевая	фолиевая кислота, 1 мг	98,5 ± 0,4	99,1 ± 0,3
Центрум	фолиевая кислота, 400 мкг витамино-минеральный комплекс	—	*

* Анализ указанного препарата не проводили методом ВЭЖХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пожарский А.Ф. // Соросовский образовательный журнал. Биология. 1996. 6. С. 25.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т.1, 2. Харьков, 1997.
3. United States Pharmacopeia. 24th ed. United States Pharmacopeia Convention. Rockville. MD. 2000.
4. Pulgarin J.A., Molina A.A., Lopez P.F. // Analyst. 1997. 122. P. 253.
5. Arruda A.F., Campiglia A.D. // Analyst. 1997. 122. P. 559.
6. Segura-Carretero A., Cruces-Blanco C., Canabe-Diaz B., Fernandez-Sanchez J.F. // Analyt. Chim. Acta. 2000. 417. P. 19.
7. Романовская Г.И., Королева М.В., Блинов А.Н., Зуев Б.К. // ЖАХ. 1999. 54. 7. С. 706.
8. Nugura N.E., King A.D. // Anal. Chem. 1989. 61. P. 1431.

Поступила в редакцию 15.06.04

PHOSPHORIMETRIC DETERMINATION OF NITROGEN HETEROCYCLES

E.M. Rekharsky, A.P. Chucharkina, T.V. Polenova, A.G. Borzenko

(Division of Analytical Chemistry)

A simple, rapid and sensitive technique based on room-temperature phosphorescence for the determination of prazosin, pindolol and folic acid has been developed. The metrological characteristics of analysis of commercial formulations has been presented and discussed.