

Рекомендована д.х.н., професором В.В.Болотовим

УДК 615.07:535.379:541.124:543

ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГІДРАЗИНОВИХ ПОХІДНИХ ФТАЛАЗИНУ ЗА РЕАКЦІЄЮ З НІТРАТОМ 9-ЦІАНО-10-МЕТИЛАКРИДИНІЮ

М.Є.Блажеєвський, П.Л.Миронюк, С.В.Баюрка,
С.А.Карпушина, В.І.Степаненко

Національний фармацевтичний університет

Вивчена хемілюмінесцентна активність гідразинових похідних фталазину — гідралазину гідрохлориду та дигідралазину сульфату в реакції з нітратом 9-ціано-10-метилакридинію у сильно-лужному середовищі у присутності кисню. Опрацьовані методики кількісного визначення гідралазину гідрохлориду і дигідралазину сульфату в субстанціях та дигідралазину сульфату у таблетках по 0,01 г “Адельфан®-Езидрекс” і “Трирезид К” методом хемілюмінесценції за реакцією з нітратом 9-ціано-10-метилакридинію. При визначенні 50 нг/мл гідралазину гідрохлориду і дигідралазину сульфату $s_{\Gamma} \leq 0,03$. Нижні межі визначуваних концентрацій гідралазину і дигідралазину — 15 і 5 нг/мл відповідно.

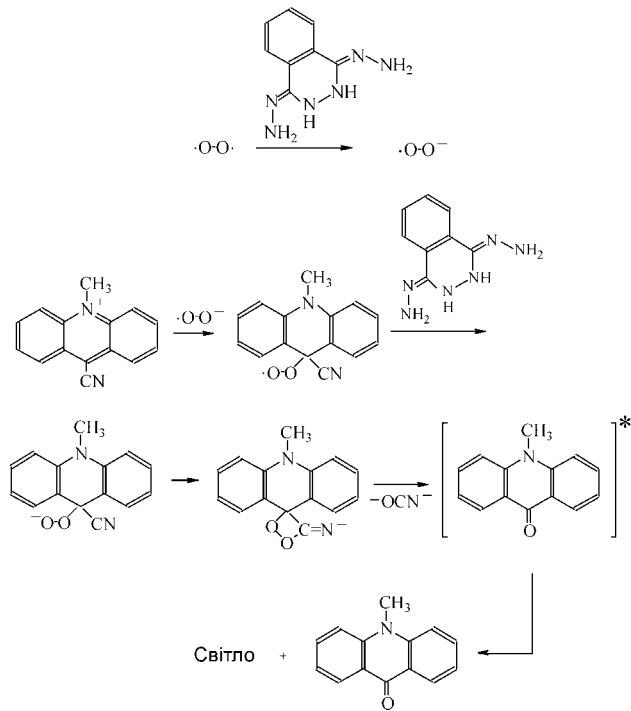
Гідразинові похідні фталазину — гідралазину гідрохлорид (1-гідразинофталазин, син. Апресин, Apresolin) (Γ), дигідралазину сульфат (1,4-дигідразинофталазину сульфат, син. Непресол) ($\Delta\Gamma$) як окремо, так і в комбінації з резерпіном, гіпотіазидом та калію хлоридом широко застосовуються як гіпотензивні засоби у вигляді пігулок по 0,01 г і 0,025 г, а також розчинів для ін'єкцій для лікування захворювань серцево-судинної системи [1, 2, 3, 4]. Для їх кількісного визначення рекомендують застосовувати йодатометричне титрування [7, 9]. Однак цей метод довготривалий і характеризується низькою репродуктивністю результатів. Метод ВЕРХ запропонований для кількісного визначення Γ та $\Delta\Gamma$ у багатокомпонентних лікарських формах [8] та у біологічних рідинах [6]. Але цей метод складний у виконанні, довготривалий та потребує дорогого обладнання. Розроблена проточно-інжекційна хемілюмінесцентна методика визначення $\Delta\Gamma$, яка ґрунтується на реєстрації хемілюмінесценції реакції окиснення його кислим розчином калію перманганату в присутності родаміну В [10]. Градувальний графік зберігає лінійний характер в інтервалі концентрацій від 5 до 800 нг/мл. S_{\min} — 2 нг/мл.

Впродовж впровадження методу хемілюмінесценції у фармацевтичний аналіз нами запропоновано здійснювати кількісне визначення гідразинових похідних фталазину за новою хемілюмінесцентною реакцією — із сіллю акридинію, а саме з нітратом 9-ціано-10-метилакридинію ($\Sigma\text{МА}$). У реакціях Γ і $\Delta\Gamma$ з $\Sigma\text{МА}$ у сильно лужному середовищі спостерігається яскрава хемілюмінесценція (ХЛ). Хімізм процесу, який приводить до виникнення хемілюмінесценції, на прикладі $\Delta\Gamma$ зображений на схемі.

У результаті редукції кисню аніонними формами гідразону ($0,03 \text{ M KOH}$ та $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M } \Sigma\text{МА}$) утворюється надоксидний аніон-радикал кисню, який приєднується до $\Sigma\text{МА}$ з утворенням проміжної нестійкої сполуки — діоксетану $\Sigma\text{МА}$. Останній розпадається з утворенням молекули N-метилакридону у збудженому стані. Релаксація збудженої молекули N-метилакридону в основний стан супроводжується вилученням кванту світла.

Запропоновані умови, опрацьовані методики та показана можливість кількісного визначення Γ і $\Delta\Gamma$ у субстанціях, а також $\Delta\Gamma$ у пігулках, покритих оболонкою по 0,01 г, “Адельфан-Езидрекс” і “Трирезид К”.

Для досліджень використовували субстанції гідралазину гідрохлориду та дигідралазину сульфату, які відповідали вимогам аналітичної нормативної документації (АНД). Розчини робочих стандартних зразків (РСЗ) препаратів, які містили 1,0 мкг/мл основної речовини гідралазину гідрохлориду ($\text{C}_8\text{H}_9\text{ClN}_4$) або дигідралазину сульфату ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$), виготовляли із субстанції об'ємно-ваговим методом. Наважку 0,1005 г порошку зразка дигідралазину сульфату, попередньо висушеного впродовж 5 год у вакуумній шафі ($P=0,7 \text{ кПа}$) при $+50^\circ\text{C}$ (вміст основної речовини $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ за даними потенціометричного титрування [9] становив 99,5%), розчиняли у двічі дистильованій воді в мірній колбі на 1000 мл, доводили до позначки при $+20^\circ\text{C}$ і ретельно перемішували. Одер-



Схема

жаний розчин із вмістом дигідралазину сульфату 0,1 мг/мл розбавляли точно у 100 разів.

Нітрат 9-ціано-10-метилакридинію добували за методикою [8]. Його розчини виготовляли об'ємно-ваговим способом на 10^{-3} М розчині нітратної кислоти. У роботі використовували концентровані розчини гідроксиду калію без карбонатів.

Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали на хемілюмінометрі з чутливістю $0,43 \cdot 10^7$ (фот)/ $(4\pi)/\text{поділка}$ із фотоелектронним помножувачем ФЕП-84-А, вимірювачем малих струмів ІМТ-0,5 та швидкодіючим потенціометром у відносних одиницях (мВ). Хемілюмінесценцію вимірювали у кварцовій кюветі циліндричної форми діаметром 30 мм з робочим об'ємом 10 мл.

Методика кількісного визначення дигідралазину сульфату у субстанції. Біля 0,1 г (точна наважка) субстанції дигідралазину сульфату, попередньо висушеної впродовж 5 год у вакуумній шафі ($P=0,7$ кПа при $+50^\circ\text{C}$), розчиняли у двічі дистильованій воді в мірній колбі на 1000 мл, доводили об'єм водою до позначки при $+20^\circ\text{C}$ і перемішували. Відбирали за допомогою піпетки 10 мл одержаного розчину і переносили в мірну колбу на 1000 мл. Об'єм доводили до позначки при $+20^\circ\text{C}$ і перемішували. У кювету хемілюмінометра послідовно вносили 1,00 мл 0,3 моль/л розчину гідроксиду натрію, 0,50 (або 0,25) мл одержаного розчину субстанції дигідралазину сульфату, $(9,50 - x)$ мл двічі дистильованої води (де x — сумарний об'єм гідроксиду натрію та розчину проби субстанції в мл), ретельно перемішували і переносили у світлонепроникну камеру фотометра, відкривали шторку і за допомогою піпеткового дозатора вливали 0,50 мл

$5 \cdot 10^{-4}$ моль/л розчину ЦМА. Реєстрували максимальне значення інтенсивності світіння. Паралельно проводили досліди, у яких замість випробуваного розчину субстанції використовували розчин РСЗ, а також двічі дистильовану воду (холостий дослід) відповідно. Розраховували різницю між значеннями максимальних інтенсивностей хемілюмінесценції, одержаних у дослідах з випробуваним розчином субстанції і розчином РСЗ дигідралазину сульфату, і максимальним значенням інтенсивності світіння, одержаного у холостому досліді з двічі дистильованою водою відповідно.

При побудові градувального графіка у кварцову кювету послідовно вносили 1,00 мл 0,3 моль/л розчину гідроксиду натрію, замість розчину проби від 0,1 до 1,00 мл розчину РСЗ дигідралазину сульфату (1 мкг/мл), $(9,50 - x)$ мл двічі дистильованої води (де x — сумарний об'єм гідроксиду натрію та розчину робочого стандартного зразка в мл), розчин ретельно перемішували і переносили у світлонепроникну камеру фотометра, відкривали шторку і за допомогою піпеткового дозатора вливали 0,50 мл $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л розчину ЦМА. У кожному випадку реєстрували максимальне значення інтенсивності світіння. Паралельно проводили дослід, у якому замість розчину РСЗ використовували двічі дистильовану воду. Розраховували різницю між значеннями максимальних інтенсивностей хемілюмінесценції, одержаних у дослідах з розчинами РСЗ дигідралазину сульфату, та максимальним значенням інтенсивності світіння, одержаним у холостому досліді з двічі дистильованою водою відповідно. Будували градувальний графік і методом найменших квадратів розраховували рівняння залежності різниці між максимальними значеннями інтенсивностей хемілюмінесценції у дослідах із РСЗ та таким із двічі дистильованою водою від концентрації дигідралазину сульфату.

Вміст дигідралазину сульфату у субстанції в перерахунку на суху речовину $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ у % розраховували за формулою:

$$\omega = \frac{\Delta I \times m_0 \times 0,9951 \times 100\%}{\Delta I_0 \times m_n},$$

де: ΔI — різниця між значеннями максимальних інтенсивностей хемілюмінесценції, одержаних у дослідах з розчином проби субстанції та двічі дистильованою водою, відн. од;

ΔI_0 — різниця між значеннями максимальних інтенсивностей хемілюмінесценції, одержаних у дослідах з розчинами РСЗ дигідралазину сульфату та двічі дистильованою водою, відн. од;

m_0 — наважка стандартного зразка порошку дигідралазину сульфату;

0,9951 — масова частка $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ у стандартному зразку дигідралазину сульфату;

m_n — наважка випробуваної субстанції, г.

Таблиця 1
Результати визначення дигідралазину сульфату і гідралазину гідрохлориду за реакцією з нітратом 9-ціано-10-метилакридинію (P=0,95)

Уведено, нг/мл	Знайдено, нг/мл	Метрологічні характеристики
Дигідралазину сульфату		
25,0	23,4	$\bar{X} = 25,1 (100,4\%)$ $S = \pm 1,19; S_x = \pm 0,53;$ $\Delta x = \pm 1,48;$ $s_r = \pm 4,7\%; \delta = +0,4\%$
25,0	26,2	
25,0	24,6	
25,0	25,0	
25,0	26,25	
50,0	50,1	$\bar{X} = 50,75 (101,5\%)$ $S = \pm 1,48; S_x = \pm 0,66;$ $\Delta x = \pm 1,83$ $s_r = \pm 2,9\%; \delta = +1,5\%$
50,0	51,6	
50,0	52,1	
50,0	53,4	
50,0	49,6	
Гідралазину гідрохлориду		
25,0	25,3	$\bar{X} = 24,9 (99,7\%)$ $S = \pm 0,98; S_x = \pm 0,44;$ $\Delta x = \pm 1,2$ $s_r = \pm 3,95\%; \delta = -0,3\%$
25,0	24,6	
25,0	23,4	
25,0	26,0	
25,0	25,3	
50,0	49,3	$\bar{X} = 50,4 (100,8\%)$ $S = \pm 1,46; S_x = \pm 0,65;$ $\Delta x = \pm 1,82$ $s_r = \pm 2,9\%; \delta = +0,8\%$
50,0	51,7	
50,0	50,7	
50,0	51,8	
50,0	48,5	

Методика визначення Г аналогічна. Рівняння градувальних графіків для Г та ДГ мали відповідно вигляд: $\Delta I = 0,15C - 0,5$ ($r = 0,999$) і $\Delta I = 0,39C + 0,2$ ($r = 0,998$). Результати визначення вмісту основної речовини у субстанціях Г та ДГ наведені в табл. 1. Як видно, при визначенні 25-50 нг/мл Г та ДГ методом стандарту s_r становить 2,9-4,7%. Нижні межі визначуваних концентрацій Г та ДГ (C_H) становлять 15 і 5 нг/мл відповідно.

Таблиця 2
Результати хемілюмінесцентного визначення дигідралазину сульфату в таблетках по 0,01 г за реакцією з нітратом 9-ціано-10-метилакридинію (P=0,95)

Вміст дигідралазину сульфату, мг	Знайдено		Метрологічні характеристики
	мг	%	
“Адельфан®-Езидрекс” (“НОВАРТИЗ”, Індія)			
10	10,5	105,0	$\bar{X} = 10,1 (101,0\%)$ $S = \pm 0,30;$ $S_x = \pm 0,14$ $\Delta x = \pm 0,38;$ $s_r = \pm 3,0\%$
	9,7	97,0	
	10,2	102,0	
	10,3	103,0	
	10,0	100,0	
“Трирезид К” (АТ “ПЛИВА” Загреб, Хорватія)			
10	10,25	102,5	$\bar{X} = 10,2 (102,0\%)$ $S = \pm 0,315;$ $S_x = \pm 0,14$ $\Delta x = \pm 0,39;$ $s_r = \pm 3,1\%$
	10,0	100,0	
	10,2	102,0	
	9,75	97,5	
	10,6	106,0	

Опрацьована методика використана для кількісного визначення ДГ у таблетках “Адельфан®-Езидрекс” складу: дигідралазину сульфату гідратованого 10 мг, 0,1 мг резерпіну, гідрохлортіазиду 10 мг, допоміжні речовини виробництва NOVARTIS (Індія) та у таблетках, покритих оболонкою, “Трирезид К” складу: дигідралазину сульфату 10 мг, 0,1 мг резерпіну, гідрохлортіазиду 10 мг, калію хлориду 350 мг і допоміжні речовини — достатня кількість виробництва АТ “ПЛИВА” (м. Загреб, Республіка Хорватія).

Методика кількісного визначення дигідралазину сульфату в таблетках по 0,01 г. Наважку розтертих таблеток, що відповідає їх середній масі (приблизно 0,14 г у випадку Адельфан®-Езидрекс або 0,4 г у випадку Трирезид К), переносили у мірну колбу на 100 мл, розчиняли в двічі дистильованій воді, доводили об’єм до позначки і перемішували. 10,00 мл розчину переносили у мірну колбу на 1000 мл і доводили об’єм до позначки двічі дистильованою водою. У кварцову кювету хемілюмінометра послідовно вносили 1,00 мл 0,3 моль/л розчину натрію гідроксиду, 0,50 мл розчину проби (або РСЗ), 7,50 мл двічі дистильованої води, ретельно перемішували і переносили у світлонепроникну камеру фотометра, відкривали шторку і вливали за допомогою піпеткового дозатора 0,50 мл $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л розчину ЦМА. Реєстрували максимальне значення інтенсивності хемілюмінесценції. Паралельно проводили досліди, у яких замість випробуваного розчину використовували розчин РСЗ з вмістом 0,1 мг/мл дигідралазину сульфату, а також двічі дистильовану воду (холостий дослід) відповідно. Розраховували різницю між максимальними значеннями інтенсивностей хемілюмінесценції, одержаних у дослідах з випробуванням розчином таблеток препарату і розчином РСЗ дигідралазину сульфату, та максимальним значенням інтенсивності світіння, одержаним у холостому досліді з двічі дистильованою водою відповідно.

Вміст дигідралазину сульфату $C_8H_{12}N_6O_4S$ в одній таблетці в мг X розраховували за формулою:

$$X = \frac{\Delta I \times C_0 \times 100 \times \bar{m}}{\Delta I_0 \times t}$$

де: ΔI — різниця між значеннями максимальних інтенсивностей хемілюмінесценції, одержаних у дослідах з випробуванням розчином таблеток дигідралазину сульфату та двічі дистильованою водою, відн. од;

ΔI_0 — різниця між значеннями максимальних інтенсивностей хемілюмінесценції, одержаних у дослідах з розчином РСЗ дигідралазину сульфату, та двічі дистильованою водою, відн. од;

C_0 — концентрація розчину РСЗ дигідралазину сульфату, 0,1 мг/мл;

m і \bar{m} — наважка та середня маса таблетки відповідно, г.

Результати визначення ДГ у таблетках по 0,01 г за допомогою запропонованої методики наведені в табл. 2.

ВИСНОВКИ

1. Опрацьовані вибіркові та достатньо чутливі методики кількісного визначення гідралазину гідрохлориду і дигідралазину сульфату методом хемілюмінесценції за реакцією з нітратом 9-ціано-10-метилакридинію у субстанціях. При визначенні 50 нг/мл гідралазину гідрохлориду і дигідрала-

зину сульфату $s_f \leq 3,0\%$. Нижні межі визначуваних концентрацій гідралазину і дигідралазину — 15 і 5 нг/мл відповідно.

2. Показана можливість використання опрацьованих методик для кількісного визначення дигідралазину сульфату у таблетках по 0,01 г “Адельфан[®]-Езидрекс” і “Трирезид К”. Встановлено, що наявність у таблетках резерпіну, гідрохлортіазиду та калію хлориду у регламентованих кількостях не заважає визначенню гідралазинових похідних фталазину.

ЛІТЕРАТУРА

1. Крыжановский С.А., Вититнова М.В. *Полный современный справочник лекарственных препаратов: Практ. руковод. 2-е изд., перераб. и доп.* — М.: РИПОЛ КЛАССИК, 2002. — 1216 с.
2. Машковский М.Д. *Лекарственные средства: 15-е изд.* — М.: ООО “Изд-во Новая Волна”, 2006. — С. 412.
3. *Руководство по медицине. Диагностика и терапия. В 2-х т. Т. 1 / Пер. с англ. под ред. Р.Беркоу, Э.Флетчера.* — М.: Мир, 1997. — С. 286.
4. *Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник.* — М.: АстраФармСервис, 1999. — С. Е-72.
5. Capta M.C.F., Richardson D.G., Chang Y.C. // *Photochem. and Photobiol.* — 1965. — Vol. 4, №6. — P. 1111-1121.
6. *Clark's Analysis of Drugs and Poisons. 3-rd Ed.* — Pharmaceutical Press, 2005 (CD).
7. *Cwiczenia z chemii lekow: Wyd. II. / Pod red. M.Gorzycowej, A.Zejca.* — Krakow: Collegium Medicum UJ, 1996. — 200 s.
8. Liao Bin // *J. China Pharm. Univ.* — 2003. — Vol. 3, №1. — P. 38-40.
9. *The European Pharmacopoeia, Suppl.* — 4-ed. Council of Europe. — Strasbourg: EDQM, 2001. — 2415 p.
10. Yang Xiao-Feng, Wu Dong-Bing, Li Hua // *J. Biolog. Chem. Luminesc.* — 2004. — Vol. 19, №6. — P. 322-327.

УДК 615.07:535.379:541.124:543

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРАЗИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФТАЛАЗИНА ПО РЕАКЦИИ С НИТРАТОМ 9-ЦИАНО-10-МЕТИЛАКРИДИНИЯ Н.Е.Блажеевский, П.Л.Миронюк, С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.И.Степаненко

Изучена хемилюминесцентная активность гидразиновых производных фталазина гидралазина гидрохлорида и дигидралазина сульфата в реакции с нитратом 9-циано-10-метилакридиния в сильнощелочной среде в присутствии кислорода. Разработаны методики количественного определения гидралазина гидрохлорида и дигидралазина сульфата в субстанциях и дигидралазина сульфата в таблетках по 0,01 г “Адельфан[®]-Езидрекс” и “Трирезид К” методом хемилюминесценции по реакции с нитратом 9-циано-10-метилакридиния. При определении 50 нг/мл гидралазина гидрохлорида и дигидралазина сульфата $s_f \leq 0,03$. Нижние границы определяемых концентраций гидралазина и дигидралазина — 15 и 5 нг/мл соответственно.

UDC 615.07:535.379:541.124:543

CHEMILUMINESCENCE DETERMINATION OF HYDRAZINE DERIVATIVES OF PHTALAZINE BY THE REACTION WITH 9-CYANO-10-METHYLACRIDINIUM NITRATE N.Ye.Blazheevsky, P.L.Mironyuk, S.V.Bayurka, S.A.Karpushina, V.I.Stepanenko

The chemiluminescence activity of hydrazine derivatives of phtalazine — hydralazine hydrochloride and dihydralazine sulfate in the reaction with 9-cyano-10-methylacridinium nitrate in a strong alkaline medium in the presence of oxygen has been studied. The methods of the quantitative determination of hydralazine hydrochloride and dihydralazine sulfate in the substances and dihydralazine sulfate in Adelfan[®]-Ezidrex and Trireside K tablets, 0.01 g, have been developed by the chemiluminescence method using the reaction with 9-cyano-10-methylacridinium nitrate. While determining 50 ng/ml of hydralazine hydrochloride and dihydralazine sulfate $s_f \leq 0,03$ the lower limits of the concentrations tested for hydralazine hydrochloride and dihydralazine sulfate were 15 and 5 ng/ml, respectively.