

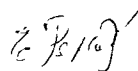
На правах рукописи

РЕХАРСКАЯ ЕКАТЕРИНА МИХАЙЛОВНА

**ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ПРОИЗВОДНЫХ НАФТАЛИНА И АЗОТСОДЕРЖАЩИХ
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЖИДКОСТЯХ**

(02.00.02. – аналитическая химия)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



МОСКВА

2005

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

- Научный руководитель: кандидат химических наук, доцент
Борзенко Андрей Геннадьевич
- Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Зоров Никита Борисович
- кандидат фармацевтических наук, ведущий научный сотрудник Эпштейн Наталья Борисовна
(Медицинский Радиологический научный центр РАМН)
- Ведущая организация: Химический факультет Санкт-Петербургского государственного университета

Защита состоится 13 октября в 16 час. 15 мин. в ауд. 344 на заседании диссертационного совета Д 501.001.88. по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, ГСП, Москва, Ленинские горы, МГУ, химический факультет

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 12 сентября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Торочешникова И.И

2006-4
12511

217 0982

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Выявление фальсифицированных фармацевтических препаратов является актуальной задачей, поскольку современные фармацевтические рынки заполнены продукцией, качество которой часто не отвечает требуемым стандартам. Подобные препараты представляют угрозу тем, что активные компоненты находятся в них в меньших, а, следовательно, терапевтически неэффективных количествах. Кроме того, в составе таких препаратов могут полностью отсутствовать компоненты, указанные на упаковке. В связи с ростом количества фальсификатов особую важность приобретает разработка экспрессных методов их анализа. Тест-методы не решают полностью проблему контроля лекарственных препаратов, поскольку они не ориентированы на проведение арбитражного количественного анализа. В настоящее время для идентификации и определения основных компонентов лекарственных форм чаще всего используют хроматографические методы, которые могут быть довольно сложны в плане предварительной пробоподготовки.

Помимо контроля качества фармацевтических препаратов можно отметить интерес исследователей к определению лекарственных соединений в различных медико-биологических объектах, в частности, в биологических жидкостях и тканях. Это объясняется усилением контроля за употреблением наркотических, психотропных и допинговых препаратов у определенных категорий людей. Основными аналитическими методами в этой области являются газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектральным детектированием. Эти методы, несмотря на их очевидные достоинства, требуют использования сложной и дорогой аппаратуры, высококвалифицированного персонала и, в связи с этим, не всегда доступны для рядовых аналитических лабораторий и мониторингового контроля.

Автор выражает искреннюю благодарность доценту кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, к.х.н. Г.В. Поленову за оказание помощи, поддержку, помощь в работе и обсуждении результатов

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
БИБЛИОТЕКА

С.Петербург

09 100 200

Требуемую чувствительность и селективность определений могут обеспечить люминесцентные методы, которые при наличии простых и экспрессных методик вполне могут составить альтернативу хроматографическим методам.

Цель работы заключалась в изучении влияния различных факторов на спектрально-люминесцентные характеристики ряда лекарственных соединений на основе производных нафталина и азотсодержащих гетероциклических соединений, и разработке люминесцентных методик их определения в фармацевтических препаратах, а также в оценке возможности их люминесцентного определения в биологических жидкостях. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить спектрально-люминесцентные свойства двух групп лекарственных соединений: производных нафталина и азотсодержащих гетероциклических соединений.
2. Изучить протолитические свойства ряда лекарственных соединений в водной, мицеллярной и циклодекстриновой средах, оценить константы связывания соединений с мицеллами додецилсульфата натрия (ДСН) и β -циклодекстрином (β -ЦД).
3. Выбрать оптимальные условия люминесцентного определения изученных соединений в водной, мицеллярной и циклодекстриновой средах при комнатной температуре.
4. Сравнить возможности флуориметрического и фосфориметрического методов для определения лекарственных соединений в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях.
5. Разработать методики определения изученных лекарственных соединений в фармацевтических препаратах.

Научная новизна. Проведено сравнительное изучение протолитических свойств модельных лекарственных соединений в водной, мицеллярной и циклодекстриновой средах. Получены количественные характеристики связывания изученных соединений с мицеллами ДСН и β -ЦД при различных

значениях pH. Изучено влияние различных факторов на сигнал фосфоресценции модельных соединений при комнатной температуре в различных средах и определены времена жизни их триплетных состояний. Для празозина, пиндолола, фолиевой кислоты и тербинафина спектры фосфоресценции в растворах измерены впервые. Изучено влияние биологической матрицы на сигнал люминесценции модельных соединений в водном и мицеллярном растворах и показана принципиальная возможность их люминесцентного определения в моче и плазме крови человека без предварительного концентрирования и удаления матрицы.

Практическая значимость работы. Предложены методики люминесцентного определения ряда лекарственных соединений на основе производных нафталина и азотсодержащих гетероциклических соединений в лекарственных препаратах, в том числе и комбинированных. Предложен подход к определению модельных лекарственных соединений в плазме крови и моче человека на основе временной селекции сигналов фосфоресценции при комнатной температуре.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты изучения спектрально-люминесцентных свойств двух групп лекарственных соединений: производных нафталина и азотсодержащих гетероциклических соединений в водной, мицеллярной и циклодекстриновой средах.
2. Результаты изучения протолитических свойств модельных лекарственных соединений в водной, мицеллярной и циклодекстриновой средах.
3. Количественные характеристики связывания изученных люминофоров с мицеллами ДСН и β -ЦД и времена жизни триплетного состояния в этих средах.
4. Результаты исследования влияния различных факторов на величину сигнала фосфоресценции модельных соединений при комнатной температуре в различных средах.

5. Методики люминесцентного определения некоторых производных нафталина и азотсодержащих гетероциклических соединений в фармацевтических препаратах.
6. Подход к определению модельных лекарственных соединений в плазме крови и моче человека, основанный на временной селекции сигналов флуоресценции при комнатной температуре

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены на Международных конференциях студентов и аспирантов «Ломоносов 2002», «Ломоносов 2004» (Россия, Москва, 2002 и 2004 гг.) и международных симпозиумах «225th ACS National Meeting» (США, Новый Орлеан, 2003 г.), «Spectroscopy in special applications» (Украина, Киев, 2003 г.), «2nd Black Sea conference on analytical chemistry» (Турция, Стамбул, 2003 г.), «Приборостроение-2003» (Украина, Винница, 2003 г.) «Аналитика России» (Россия, Клязьма, 2004 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ: 3 статьи в открытой печати, 1 статья в сборнике и 6 тезисов докладов.

Структура и объем работы Диссертация состоит из введения, двух глав обзора литературы, пяти глав экспериментальной части, выводов и списка литературы. Во введении обосновывается актуальность темы и цель работы, ее новизна и практическая значимость. Первая глава обзора литературы посвящена основным направлениям развития флуоресценции при комнатной температуре (ФКТ), вторая глава – современным методам определения лекарственных соединений в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях, последующие главы содержат экспериментальные результаты. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, включает 49 рисунков и 17 таблиц. Список литературы содержит 177 работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальная часть

Исходные растворы модельных соединений с концентрацией $3 \cdot 10^{-4}$ М готовили растворением точных навесок. Нафазолина гидрохлорид, тербинафина гидрохлорид, (Sigma, США), пропранолола гидрохлорид, празозина гидрохлорид и фолиевую кислоту (Wako, Япония) растворяли в воде, дипиридамола, пиндолола (Wako, Япония) - в водном солянокислом растворе, напроксен (Sigma, США) - в водном растворе гидроксида натрия.

При измерении сигнала ФКТ в мицеллярной среде порядок добавления веществ был следующий. В мерную колбу емк. 10,0 мл помещали 0,1 мл исходного раствора люминофора, 2,0 – 2,5 мл 0,1 М раствора ДСН в зависимости от соединения, 0,6 мл 0,25 М раствора $TiNO_3$, 0,5 – 1,0 мл в зависимости от соединения 0,1 М раствора сульфата натрия и доводили до метки водой. Колбу с полученным раствором помещали на 5 мин в ультразвуковую ванну (УЗВ) при $t = 30 - 35$ °С. После ультразвуковой обработки растворы выдерживали при комнатной температуре 5 мин, затем производили измерения.

Для измерения сигнала ФКТ в водной среде порядок добавления веществ был следующий. В колбу емк. 10,0 мл помещали 0,1 мл исходного раствора, навеску сухого иодида калия (0,1- 1,0 г) в зависимости от соединения, 1,0 – 2,0 мл 2,0 М нитрата таллия в зависимости от соединения, 1,0 мл 0,1 М раствора сульфата натрия и доводили до метки водой. В том же порядке готовили анализируемый раствор для измерения сигнала в циклодекстриновой среде. После добавления всех веществ раствор доводили до метки раствором с концентрацией β -ЦД равной $1.5 \cdot 10^{-2}$ М.

Спектры возбуждения и флуоресценции растворов измеряли на спектрофлуориметре «Shimadzu RF-5301» (Япония) при следующих параметрах сканирования: спектральная ширина щелей 3 нм, скорость сканирования 1 нм/с. Спектры фосфоресценции растворов измеряли на спектрофлуориметре

«Панорама» (фирма «Люмэкс», Россия). Для измерения использовали кварцевые кюветы ($l = 1$ см).

Значения pH растворов контролировали на универсальном иономере ЭВ-74 со стеклянным электродом ЭСЛ 43-07.

Хроматографические исследования проводили на жидкостном хроматографе «Shimadzu LC-10AT» (Япония) с УФ детектором. В работе использовали колонку Mightysil RP-18 размером 150×4.6 мм (5 μ).

Спектрально-люминесцентные характеристики

В качестве модельных лекарственных препаратов в работе изучены представители двух классов органических соединений – азотсодержащих гетероциклических соединений и нафталиновых производных (табл. 1.). Фармацевтические препараты на основе этих соединений широко применяются в медицинской практике.

Жесткая структура выбранных соединений позволяет получать хорошо разрешенные спектры флуоресценции и фосфоресценции при комнатной температуре.

Спектры флуоресценции и фосфоресценции исследованных соединений представляли в 3-х мерном виде. В качестве примера на рис. 1 приведены спектры флуоресценции и фосфоресценции пропранолола.

Спектры флуоресценции хорошо согласуются с литературными данными. Спектры фосфоресценции исследуемых соединений менее изучены. По-видимому, изучение спектров фосфоресценции празозина, пиндолола, фолиевой кислоты и тербинафина проводилось впервые.

Выбор оптимальных длин волн возбуждения и регистрации индивидуальных соединений с использованием трехмерных спектров в значительной степени упрощается. В табл. 2 представлены оптимальные значения длин волн возбуждения, флуоресценции и фосфоресценции. Подчеркнуты наиболее интенсивные линии, которые в дальнейшей работе использовали для возбуждения.

Таблица 1. Названия и структурные формулы изученных соединений и препаратов

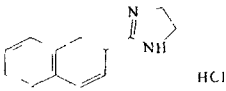
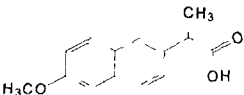
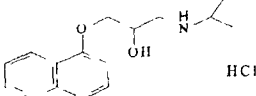
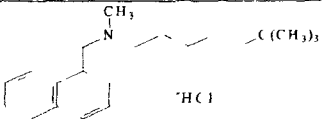
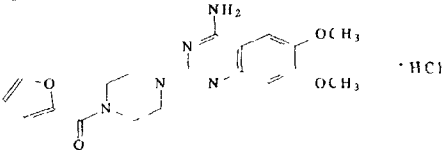
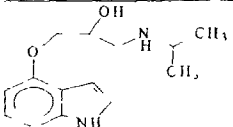
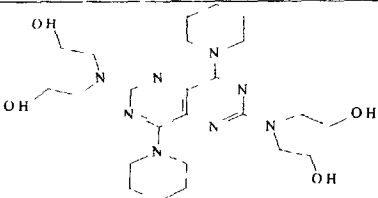
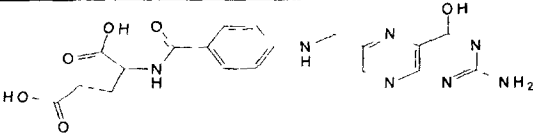
Название	Структурная формула	Препараты
Нафазолина гидрохлорид		Нафтин Санорин-аналергин
Напроксен		Напроксен-Акри Пенталгин-Н
Пропранолола гидрохлорид		Обзидан Алаприлин
Тербинафина гидрохлорид		Ламизил Фунготербин
Празозина гидрохлорид		Празозин
Пиндолол		Вискен Вискальдикс
Дипиридамол		Курантил Дипиридамол
Фолиевая кислота		Фолиевая кислота

Таблица 2. Длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции и фосфоресценции изученных соединений

Название	$\lambda_{\text{возб}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	$\lambda_{\text{фос}}$, нм
Нафазолин	<u>282</u> , 290	325, 337	485, 518
Тербинафин	<u>286</u> , 297	341, 355	487, 521
Напроксен	235, 275, 319, <u>331</u>	354	513, 548
Пропранолол	242, <u>297</u>	337, 351	490, 524
Дипиридамол	309, <u>420</u>	494	615
Празозин	270, <u>341</u>	390	505
Пиндолол	292	308, 318	450
Фолиевая кислота	<u>270</u> , 333	365, 444	530

На интенсивность люминесценции большое влияние оказывает форма нахождения люминофора в растворе и его ближайшее окружение. Эти факторы относительно слабо влияют на интенсивность флуоресценции и достаточно сильно на интенсивность фосфоресценции, что важно при разработке фосфориметрических методик. Для увеличения интенсивности фосфоресценции в качестве модификаторов свойств среды часто используют мицеллы ПАВ и циклодекстрины.

Изучение распределения люминофоров в водно-мицеллярной и водно-циклодекстриновой средах

Распределение веществ между водной средой и мицеллами ПАВ или β -циклодекстрином характеризуется константой связывания, величина которой содержит информацию о степени солубилизации или комплексобразования. На основе значений этих констант можно прогнозировано выбирать оптимальные условия при разработке люминесцентных методик. К сожалению, литературных данных о константах связывания в мицеллярных и циклодекстриновых средах для большинства изученных в работе соединений найти не удалось.

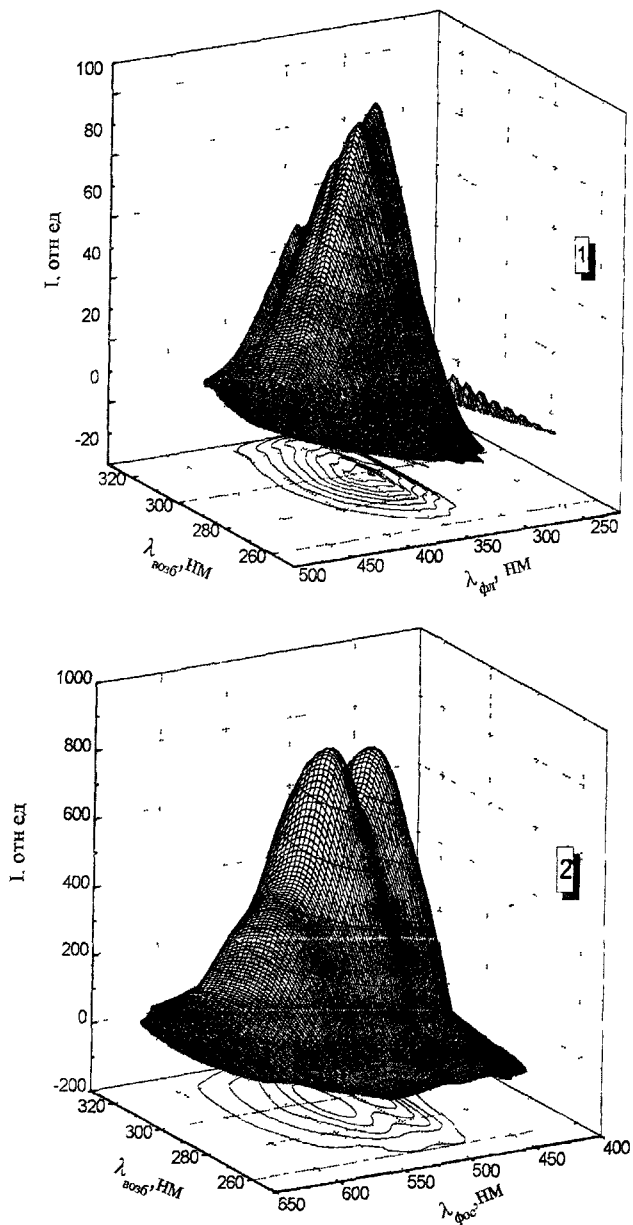


Рис. 1. Спектры флуоресценции (1) и фосфоресценции (2) пропранолола

Значения констант связывания в среде ДСН определяли экспериментально по тушению флуоресценции молекулами, имеющими заряд одноименный с зарядом мицеллы. В качестве тушителя использовали иодид-ион. Рассчитанные значения констант связывания люминофоров с мицеллами ДСН при различных рН приведены в табл. 3. Как видно из представленных в таблице данных для люминофоров нафталинового ряда константы связывания с мицеллами оказываются больше, чем для азотсодержащих гетероциклических соединений. По-видимому, это может быть объяснено большей гидрофобностью нафталинового кольца

Таблица 3. Значения констант связывания люминофоров (IgK) с мицеллами ДСН

Соединение	pH = 2.4	pH = 8.4	pH = 11.2
Напроксен	$5,3 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$
Нафазолин	$4,0 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,1$
Пропранолол	$4,3 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,1$
Тербинафин	$4,2 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,2$
Дипиридамол	$3,2 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$
Фолиевая кислота	$4,0 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$
Пиндолол	$3,4 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$
Празозин	$3,9 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,1$

Для определения констант связывания изученных соединений с β -циклодекстрином применяли метод Бенеси-Гилдебранда. Рассчитанные значения констант связывания люминофоров с β -циклодекстрином при различных рН приведены в табл. 4.

Таблица. 4. Значения констант связывания ($\lg K$) изученных соединений с β -ЦД

Соединение	pH = 2.4	pH = 8.4	pH = 11.2
Напроксен	3,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1
Нафазолин	2,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,65 ± 0,1
Пропранолол	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,1
Тербинафин	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Дипиридамо́л	3,2 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,8 ± 0,1
Фолиевая кислота	3,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,9 ± 0,1
Пиндолол	2,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,90 ± 0,04
Празозин	2,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,81 ± 0,05

Как следует из таблицы, кислотность среды оказывает влияние на величины констант связывания наряду с такими факторами, как гидрофобность молекулы люминофора, соответствие геометрии циклодекстриновой полости размерам и пространственному расположению заместителей люминофора.

Многие гетероциклические соединения (дипиридамо́л, фолиевая кислота и празозин) и напроксен образуют достаточно прочные комплексы с β -циклодекстринами. Однако полного вхождения молекулы люминофоров в циклодекстриновую полость, по-видимому, не происходит. Этот факт подтверждается не слишком высокими значениями констант связывания, а также малым влиянием циклодекстрина на кислотно-основные свойства этих соединений.

В целом, использование только термодинамического подхода для изучения свойств окружения люминофора оказывается недостаточным для получения полной информации о системе. Как показали наши эксперименты, образование прочных комплексов и ассоциатов с молекулами модификатора среды не всегда приводит к увеличению сигнала ФКТ. По-видимому, более корректно при изучении свойств окружения люминесцирующей молекулы совместное использование термодинамического и кинетического подходов. В связи с этим,

представляло интерес определить времена жизни молекул люминофора в триплетном состоянии в присутствии изученных модификаторов.

Определение времени жизни люминофоров в триплетном состоянии в различных средах

Оценку времени жизни люминофоров в различных средах проводили, изучая кинетические зависимости интенсивности сигнала ФКТ. Рассчитанные времена жизни изученных соединений в водной, мицеллярной и циклодекстриновой средах, указаны в табл. 5. Отметим, что в мицеллярной среде времена жизни исследованных соединений почти на порядок выше, чем в водной. Этот факт можно объяснить их высокой степенью солубилизации в мицеллах ДСН. В циклодекстриновой среде лишь для напроксена время жизни триплетного состояния такое же, как в мицеллярной среде.

Таблица 5. Время жизни люминофоров в различных средах (мс)

Соединение	$\tau_{ДСН}$	$\tau_{\beta-ЦД}$	$\tau_{водн}$
Напроксен	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Нафазолин	3.7 ± 0.1	0.15 ± 0.04	0.47 ± 0.09
Пропранолол	4.0 ± 0.2	0.37 ± 0.07	0.23 ± 0.04
Тербинафин	1.1 ± 0.1	-	-
Дипиридамол	0.6 ± 0.1	0.35 ± 0.05	0.28 ± 0.06
Пиндолол	0.4 ± 0.1	0.17 ± 0.06	0.08 ± 0.02
Празозин	0.9 ± 0.1	-	-
Фолиевая кислота	0.6 ± 0.1	-	-

Полученные результаты хорошо согласуются с результатами исследования кислотно-основных свойств люминофоров и их связывания с мицеллами ДСН и β -циклодекстрином. Данные по кинетике фосфоресценции подтверждают предположение о том, что использование циклодекстрина в качестве организованной среды целесообразно лишь для фосфориметрического определения напроксена.

Изучение протолитических свойств модельных препаратов в водной, водно-мицеллярной и водно-циклодекстриновой средах

Форма нахождения люминофора в растворе является важным фактором, влияющим на интенсивность люминесценции. Очевидно, что интенсивность люминесценции изученных соединений в значительной мере будет определяться протолитическими равновесиями в растворе. Представляло интерес оценить значения констант кислотности модельных соединений в водной и организованных средах для последующего выбора оптимальных условий измерения аналитического сигнала. В работе были измерены спектры возбуждения и флуоресценции в водной, мицеллярной и циклодекстриновой средах при различных значениях pH. На основе полученных данных были рассчитаны константы кислотности, значения которых приведены в табл. 6. В мицеллярном растворе при концентрации ДСН выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) для большинства соединений значение pK_a увеличивается по сравнению с водной средой, что хорошо согласуется с данными по константам связывания.

Таблица 6. Значения $pK_a^{фл}$ модельных соединений в водной, ДСН и β -ЦД средах

Соединения	$pK_a^{фл}$ водн	$pK_a^{фл}$ ДСП	$pK_a^{фл}$ β -ЦД
Нафазолин	10,2±0,2	12,4±0,1	10,0±0,2
Напроксен	4,4±0,2	4,9±0,2	4,8±0,1
Тербинафин	6,8±0,2	10,2±0,1	6,8±0,1
Пропранолол	10,8±0,1	11,9±0,2	10,6±0,1
Празозин	6,9±0,1	9,3±0,1	6,5±0,2
Пиндолол	8,2±0,1	10,7±0,1	8,0±0,2
Дипиридамо	6,4±0,1	8,3 ±0,1	6,0±0,1
	12,4±0,1	-	12,2±0,1
Фолиевая кислота	2,5±0,1	3,3±0,2	2,1±0,2
	8,1±0,1	8,6±0,1	8,2±0,1

В циклодекстриновых средах наблюдаются незначительные изменения констант кислотности по сравнению с водой. Так, например, для нафазолина, пропранолола, дипиридамола, пиндолола и празозина наблюдается небольшое уменьшение значений pK_a . Этот факт, по-видимому, также может служить подтверждением предположения о неполном вхождении изученных соединений в циклодекстриновую полость.

Влияние различных факторов на фосфоресценцию люминофоров при комнатной температуре

Общепринято, что для генерации аналитического сигнала фосфоресценции при комнатной температуре требуется наличие организованной среды, "тяжелого атома" и отсутствие молекулярного кислорода. С целью выбора оптимальных условий регистрации сигнала ФКТ представляло интерес изучить влияние каждого фактора.

ФКТ в мицеллярной среде. В среде додецилсульфата натрия в качестве источника "тяжелого атома", использовали нитрат таллия(I). Для удаления кислорода в исследуемый раствор добавляли сульфит натрия. В ходе исследования были выбраны оптимальные концентрации требуемых реагентов и диапазон значений pH, которые легли в основу разработанных в работе методик определения модельных лекарственных соединений в фармацевтических препаратах (табл. 7)

ФКТ в водной среде С целью разработки более экономичной методики представляло интерес выбрать условия измерения сигнала ФКТ в отсутствии организованной среды. Для возникновения ФКТ в этом случае по-прежнему необходимым условием является присутствие в растворе источника "тяжелого атома" и сульфита натрия.

Наилучшие результаты для нафазолина, пропранолола и пиндолола были достигнуты с использованием иодида калия. Для напроксена и дипиридамола наилучшие результаты были получены по-прежнему с использованием нитрата таллия. Для этих соединений определены оптимальные условия и концентрации

требуемых реагентов, которые положены в основу методик определения в фармацевтических препаратах, плазме крови и моче (табл. 8).

Таблица 7. Оптимальные значения pH и концентрации реагентов для получения сигнала ФКТ в водно-мицеллярной среде

Соединение	pH	c_{HNO_3} М	$c_{Na_2SO_3}$ М	$c_{ДСП}$ М
Нафазолин, Пропранолол	8 - 9	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$5.0 \cdot 10^{-3}$	$2.0 \cdot 10^{-2}$
Напроксен	8 - 9	$2.0 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$
Тербинафин	8 - 9	$2.0 \cdot 10^{-2}$	$7.0 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$
Дипиридамол	8 - 9	$2.25 \cdot 10^{-2}$	$7.0 \cdot 10^{-3}$	$3.0 \cdot 10^{-2}$
Фолиевая кислота	7.5 - 8.5	$1.25 \cdot 10^{-2}$	$7.0 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$
Празозина	7.5 - 8.5	$1.25 \cdot 10^{-2}$	$7.0 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$
Пиндолол	7 - 8.5	$1.75 \cdot 10^{-2}$	$7.0 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$

Таблица 8. Оптимальные значения pH и концентрации реагентов для получения сигнала ФКТ в водной среде

Соединение	pH	c_{HNO_3} М	c_{KR} М	$c_{Na_2SO_3}$ М
Нафазолин, Пропранолол	8 - 9	-	0,4	$1.0 \cdot 10^{-2}$
Напроксен	8 - 9	0,15	-	$1.0 \cdot 10^{-2}$
Дипиридамол	8.5 - 10	0,20	-	$1.0 \cdot 10^{-2}$
Пиндолол	7-8	-	0,6	$1.0 \cdot 10^{-2}$

Люминесцентное определение изученных соединений в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях

Определение активных компонентов в фармацевтических препаратах

Выбранные ранее оптимальные условия использовали для измерения аналитического сигнала и построения градуировочных зависимостей при фосфориметрическом определении исследуемых соединений в водной и мицеллярной средах. Рассчитанные метрологические характеристики приведены в табл. 9. Для сравнения в табл. 10 приведены метрологические характеристики флуориметрического определения напроксена, нафазолина и пиндолола.

Непосредственное определение исследуемого компонента в лекарственных препаратах проводили, следуя разработанным методикам. Результаты определений активных компонентов в препаратах представлены в табл. 11. Проверку правильности проводили с использованием независимого метода ВЭЖХ по стандартным методикам.

Для препаратов, где определяемый компонент является единственным активным веществом, наблюдается полное согласие результатов, полученных при использовании люминесцентных и ВЭЖХ методик.

В комбинированных препаратах флуориметрическое определение в ряде случаев приводит к завышенным результатам по сравнению со значением, заявленным производителем. Например, для препарата Пенталгин Н повышенное содержание напроксена обусловлено свечением сопутствующих компонентов – кофеина, анальгина и фенobarбитала. При фосфориметрическом определении для комбинированных препаратов наблюдается хорошее согласие результатов с заявленными значениями, а также с результатами, полученными методом ВЭЖХ.

Таблица 9. Метрологические характеристики фосфориметрического определения люминофоров в водной и водно-мицеллярной средах (n=3, P=0.95)

Соединение	Среда	Диапазон линейности, М	Коэффициент корреляции	Предел обнаружения, М
Нафазолин	водная	$1.0 \cdot 10^{-7} - 8.0 \cdot 10^{-5}$	0.999	$1.3 \cdot 10^{-7}$
	мицеллярная	$5.0 \cdot 10^{-8} - 8.0 \cdot 10^{-5}$	0.996	$3.2 \cdot 10^{-8}$
Тербинафин	мицеллярная	$5.0 \cdot 10^{-7} - 1.0 \cdot 10^{-5}$	0.989	$1.2 \cdot 10^{-7}$
Пропранолол	водная	$1.0 \cdot 10^{-7} - 3.0 \cdot 10^{-5}$	0.999	$9.0 \cdot 10^{-8}$
	мицеллярная	$6.0 \cdot 10^{-8} - 3.0 \cdot 10^{-5}$	0.996	$1.2 \cdot 10^{-8}$
Напроксен	водная	$2.0 \cdot 10^{-7} - 9.0 \cdot 10^{-4}$	0.998	$1.3 \cdot 10^{-7}$
	мицеллярная	$8.0 \cdot 10^{-8} - 6.0 \cdot 10^{-5}$	0.994	$4.5 \cdot 10^{-8}$
Дипиридамол	водная	$8.0 \cdot 10^{-7} - 6.0 \cdot 10^{-5}$	0.993	$6.0 \cdot 10^{-7}$
	мицеллярная	$1.0 \cdot 10^{-7} - 2.0 \cdot 10^{-5}$	0.999	$9.5 \cdot 10^{-8}$
Пиндолол	водная	$9.0 \cdot 10^{-7} - 1.0 \cdot 10^{-5}$	0.994	$7.5 \cdot 10^{-7}$
	мицеллярная	$7.0 \cdot 10^{-7} - 1.0 \cdot 10^{-5}$	0.984	$5.0 \cdot 10^{-7}$
Празозин	мицеллярная	$5.7 \cdot 10^{-7} - 2.0 \cdot 10^{-5}$	0.998	$3.0 \cdot 10^{-7}$
Фолиевая кислота	мицеллярная	$6.0 \cdot 10^{-7} - 2.0 \cdot 10^{-5}$	0.987	$4.2 \cdot 10^{-7}$

Таблица 10. Метрологические характеристики флуориметрического определения напроксена, пиндолола и нафазолина в воде (n=3, P=0,95)

Соединение	Диапазон линейности, М	Коэффициент корреляции	Предел обнаружения, М
Напроксен	$1.2 \cdot 10^{-8} - 1.0 \cdot 10^{-6}$	0.999	$9.0 \cdot 10^{-9}$
Пиндолол	$1.0 \cdot 10^{-7} - 3.0 \cdot 10^{-6}$	0.999	$5.0 \cdot 10^{-8}$
Нафазолин	$1.5 \cdot 10^{-8} - 3.0 \cdot 10^{-6}$	0.999	$9.8 \cdot 10^{-9}$

Таблица 11. Определение активного компонента в лекарственных препаратах методами Фл, ФКТ и ВЭЖХ (n = 5, P = 0.95)

Препарат	Содержание активных компонентов в одной таблетке	Найдено определяемого компонента, %			
		Фл _{водн}	ФКТ _{миц}	ФКТ _{водн}	ВЭЖХ
Пенталин Н	напроксен, 100 мг анальгин, 300 мг кофеин, 50 мг кодеин 8 мг фенобарбитал, 10 мг	108±3	98±3	97±3	*
Напроксен-Акри	напроксен, 250 мг	98±2	98±2	97±3	98±6
Нафтизин	нафазолин, 10 мг в 10 мл капель	100±2	98±4	97±4	95±3
Санорин-аналергин	нафазолин, 2,5 мг в 10 мл капель антазолин, 50 мг в 10 мл капель	95±2	96±3	97±3	92±5
Анаприлин	пропранолол, 10 мг	96±2	97±2	98±3	102±3
Обзидан	пропранолол, 40 мг	98±2	99±2	99±3	101±4
Ламизил	тербинафин, 10 мг на 1 г крема	102±2	96±3	-	*
Фунготербин	тербинафин, 250 мг	98±3	98±4	-	*
Празозин	празозин, 0,5 мг	97±4	98±2	-	98±3
Вискен	пиндолол, 5 мг	98±2	98±3	96±3	94±3
Вискальдикс	пиндолол, 10 мг клопамид, 5 мг	107±3	98±2	99±4	95±6
Кислота фолиевая	фолиевая кислота, 1 мг	97±2	97±4	-	*

* - определение активного компонента методом ВЭЖХ не проводили

Сравнение двух вариантов фосфориметрического определения, использующих водную и водно-мицеллярную среды свидетельствует о том, что они дают сопоставимые результаты. Однако при выборе методики определения следует учитывать не только метрологические характеристики, но и стоимость анализа. Применение водных сред дает следующие очевидные преимущества. Во-первых, снижается количество используемых реагентов, во-вторых, в качестве источника "тяжелого атома" используется иодид калия, который значительно менее токсичен и более дешев по сравнению с нитратом галлия. Относительное стандартное отклонение обеих методик составляет не более 0,05.

Полученные в работе результаты дают основание полагать, что разработанные методики, основанные на измерении интенсивности люминесцентного сигнала могут быть использованы для определения активных компонентов различных лекарственных препаратов. Причем, для комбинированных препаратов целесообразнее использовать фосфориметрические методики, поскольку они оказываются более избирательными.

Определение изученных лекарственных соединений в биологических жидкостях. Представляло интерес оценить возможности люминесцентных методов применительно к определению лекарственных препаратов в биологических жидкостях – плазме крови и моче. Одной из важных стадий при этом является пробоподготовка. Использование люминесцентных методов позволяет, на наш взгляд, в ряде случаев обойтись без предварительного выделения определяемых компонентов матрицы.

На примере пропранолола, была изучена возможность определения β адреноблокаторов в моче и плазме крови люминесцентными методами.

Поскольку сигнал флуоресценции пигмента уробилина, входящего в состав мочи, достаточно интенсивен, использование традиционной флуориметрии представляется малоэффективным. В этом случае фосфориметрическое определение представляется более целесообразным, поскольку фоновый сигнал

матрицы отсутствует. Отметим, что при проведении определения требуется разбавление исходного образца в 50 раз.

При определении пропранолола в плазме крови было установлено, что матрица имеет собственные спектры флуоресценции и фосфоресценции, причем спектры флуоресценции пропранолола и матрицы перекрываются практически полностью, а спектры фосфоресценции лишь частично. Изучение кинетических характеристик сигнала ФКТ показало, что время жизни триплетного состояния пропранолола в несколько раз больше, чем время жизни фосфоресцирующих компонентов плазмы крови. В работе было показано, что временная селекция сигнала ФКТ позволяет избирательно регистрировать спектр фосфоресценции только пропранолола (рис. 2). Одним из отличий определения пропранолола в плазме крови от определения в моче заключается в том, что для наблюдения фосфоресцентного сигнала достаточно 10 кратного разбавления образца плазмы.

Проверку правильности методики определения пропранолола в плазме крови проводили методом "введено-найдено". Результаты представлены в табл. 12-13.

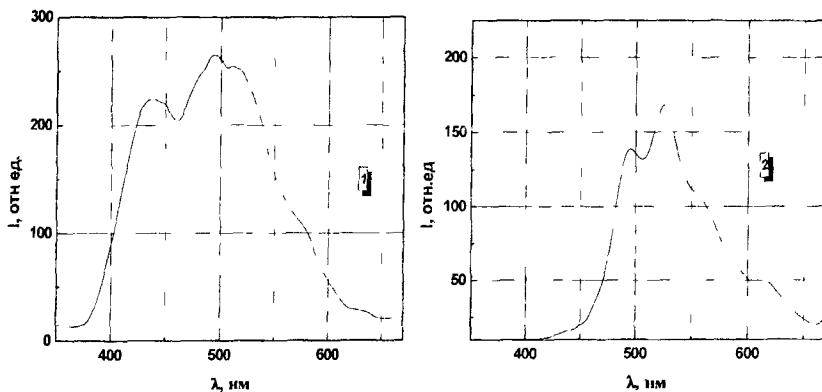


Рис. 2. Спектр фосфоресценции пропранолола в плазме крови без использования временной селекции (1), с временной селекцией (2).

Таблица 12. Результаты определения пропранолола в моче (n = 3, P = 0,95)

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл
0,04	0,03±0,01
0,08	0,08±0,01
0,10	0,11±0,01
0,20	0,18±0,01
0,40	0,37±0,02

Таблица 13. Результаты определения пропранолола в плазме крови (n = 3, P = 0,95)

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл
0,05	0,05±0,01
0,07	0,07±0,01
0,09	0,08±0,01
0,10	0,09±0,01

Полученные результаты подтверждают принципиальную возможность использования люминесцентных методов для определения лекарственных соединений в биологических жидкостях.

Результаты работы могут быть использованы в различных организациях, занимающихся фундаментальными исследованиями в области аналитической химии, биохимии, фармацевтики, а также в практических целях лабораториями по контролю за качеством фармацевтической продукции.

ВЫВОДЫ

1. Изучены спектрально-люминесцентные характеристики представителей двух классов лекарственных органических соединений и на основе анализа трехмерных спектров люминесценции выбраны оптимальные длины волны возбуждения. Показано, что форма и положение полос в спектрах фосфоресценции большинства соединений, измеренных в мицеллярной, водной и циклодекстриновой средах, практически не отличаются

2. Рассчитаны значения констант связывания изученных люминофоров с мицеллами ДСН и β -ЦД. Оценены времена жизни изученных люминофоров в триплетном состоянии в этих средах. Наибольшее время жизни люминофоров в триплетном состоянии отмечено в мицеллах ДСН, наименьшее – в β -ЦД, за исключением напроксена. Установлено, что использование ДСН в качестве модификатора среды возможно для всех соединений, а β -ЦД - целесообразно лишь для фосфориметрического определения напроксена.

3 Проведено сравнительное изучение кислотно-основных свойств модельных лекарственных соединений в водной, ДСН и β -ЦД средах. Установлено, что значения pK_a в водной и β -ЦД средах различаются незначительно, а в мицеллярной среде наблюдается увеличение pK_a по сравнению с водной средой. На основании этих данных и данных по кинетике фосфоресценции высказано предположение о неполном вхождении молекул изученных соединений в циклодекстриновую полость

4 Изучено влияние различных факторов на сигнал фосфоресценции изученных соединений при комнатной температуре в водной, мицеллярной и циклодекстриновой средах и выбраны оптимальные условия их фосфориметрического определения.

5. Разработаны методики люминесцентного определения изученных соединений в фармацевтических препаратах, в том числе и комбинированных. Правильность предложенных методик подтверждена методом ВЭЖХ.

6. Дана сравнительная оценка метрологических характеристик определения исследованных соединений в фармацевтических препаратах методами флуориметрии и фосфориметрии. Показано, что для комбинированных препаратов целесообразнее использовать фосфориметрические методики, поскольку они оказываются более избирательными.

7. Предложен подход к определению модельных лекарственных соединений в плазме крови и моче человека, основанный на временной селекции сигналов фосфоресценции при комнатной температуре. На примере пропранолола показано, что временная селекция сигнала ФКТ позволяет устранить мешающее влияние собственной фосфоресценции матрицы.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Rekharsky E.M., Polenova T.V., Borzenko A.G. Determination of drugs with closely overlapping spectra by room temperature phosphorimetry. / Abstract. 225th ACS National Meeting. New Orleans. Louisiana USA. 2003. P. 169.

2. Rekharsky E.M., Polenova T.V., Borzenko A.G. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by spectrofluorimetry. / Тез. докл. междунар. конф. студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2002». М.: МГУ, 2002. С. 149.

3. Rekharsky E.M., Polenova T.V., Borzenko A.G. Determination of some drugs by room temperature phosphorimetry in organized media / Abstract. International scientific and practical conference "Spectroscopy in special applications". Kiev. Ukraine. 2003. P. 72.

4. Rekharsky E.M., Polenova T.V., Borzenko A.G. Room-temperature phosphorimetric determination of some drugs in pharmaceutical preparation / Abstract 2nd Black Sea conference on analytical chemistry. Istanbul. Turkey. 2003. P. 049.

5. Rekharsky E.M., Polenova T.V., Borzenko A.G. Organized media – the base for the phosphorimetric determination of some drugs / Mat. XII междунар. науч.

тех конф. «Приборостроение - 2003». Винница-Жорез. Украина. 2003. С. 205-208.

6. Рехарская Е. М., Поленова Т.В. Борзенко А.Г. Фосфоресценция некоторых лекарственных препаратов нафталинового ряда в водных средах. // Вестн Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004 Т 45. № 2. С. 112-116.

7. Рехарская Е. М., Чухаркина А.П., Поленова Т.В. Борзенко А.Г. Фосфориметрическое определение нафталиновых производных в лекарственных препаратах / Тез. докл Межд. конф. студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2004». М.: МГУ, 2004. С. 40.

8. Рехарская Е. М., Чухаркина А.П., Поленова Т.В. Борзенко А.Г. Фосфориметрическое определение активного компонента в лекарственных препаратах. / Тез. докл межд. симпозиума «Аналитика России-2004». Клязьма. Россия 2004. С. 182.

9. Рехарская Е. М., Чухаркина А.П., Поленова Т.В. Борзенко А.Г. Фосфориметрическое определение азотных гетероциклов в лекарственных препаратах. // Вестн. Моск. ун-та Сер. 2. Химия. 2005. Т. 46. № 1. С. 49-54

10. Рехарская Е. М., Поленова Т.В. Борзенко А.Г. Фосфориметрическое определение активного компонента в лекарственных препаратах. // Журн. аналит. хим. 2005. Т 60 № 5 С. 279-285.

Подписано в печать 09 09 05
Тираж 100 экз. Заказ № 108.
Отпечатано в ООП МГУ

№ 16 2 4 1

РНБ Русский фонд

2006-4

12511