

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2010

А. О. Долинкин¹, М. С. Черновьянц¹

АНАЛИЗ ГЕТЕРОАРОМАТИЧЕСКИХ ТИОАМИДОВ — ПРЕПАРАТОВ ТИРЕОСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ (ОБЗОР)

¹ Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

В настоящем обзоре представлены широко применяемые в фармацевтической и клинической практике методы идентификации и количественного определения препаратов тиреостатического действия — производных имидазолин-2-тиона и урацил-2-тиона. Уделено внимание стадиям пробоподготовки образцов (твердофазной и жидкостной экстракции из биологических матриц) и химического модифицирования молекул препаратов. Приведена схема гипотетической модели ингибирующего действия препаратов тиреостатиков на биосинтез гормонов щитовидной железы. Представленные в обзоре аналитические характеристики отдельных методик определения тиреостатиков могут быть использованы в производстве на стадии контроля качества.

Ключевые слова: гетероароматические тионы, производные имидазола и урацила, гипотетическая модель анти tireоидного действия, хроматографические, вольтамперометрические, титриметрические методы определения, химическое модифицирование.

Гетероароматические тиоамиды, в том числе производные имидазола и урацила: 1-метилимидазолин-2-тион (метимазол, мерказолил, MMI), 1-карбэтокси-3-метилимидазолин-2-тион (карбимазол, Carb), 6-*n*-пропил-2-тиоурацил (пропилтиоурацил, PTU), 6-метил-2-тиоурацил (метилтиоурацил, MTU), 2-тиоурацил (TU) относятся к жизненно важным гетероциклическим системам, действие которых направлено на регулирование функции щитовидной железы при тиреотоксикозе, болезни Грейвса и других патологиях [1]. Анти tireоидные (тиреостатические) препараты ускоряют выведение из щитовидной железы йодидов, угнетают активность ферментных систем, участвующих в окислении йодид-ионов и ингибируют выброс тиреотропного гормона гипофиза [2]. Перорально принимаемые препараты экскретируются с мочой [3].

Попытки объяснить механизм ингибирующего действия препаратов-тиреостатиков на стадии синтеза тиреоидных гормонов щитовидной железы — прогормона T₄ (3,3',5,5'-тетрайод-L-тиронина) и его активной формы T₃ (3,3',5-трийод-L-тиронина) — предпринимались неоднократно [4–6]. Химическим методам получения T₃ и T₄ на основе моделирования их биосинтеза посвящен обзор [7]. Большинство современных исследователей рассматривают процесс образования тиреоидных гормонов как конденсацию 2 остатков дийодтирозина, входящих в состав тиреоглобулина [8]. Существуют 2 гипотезы, касающиеся биосинтеза T₃: одни исследователи [9] полагают, что он образуется при конденсации остатков дийодтирозина и моноидтирозина, согласно другим данным, T₃ образуется при избирательном деиодировании T₄ в щитовидной железе и периферических органах и тканях [10]. На

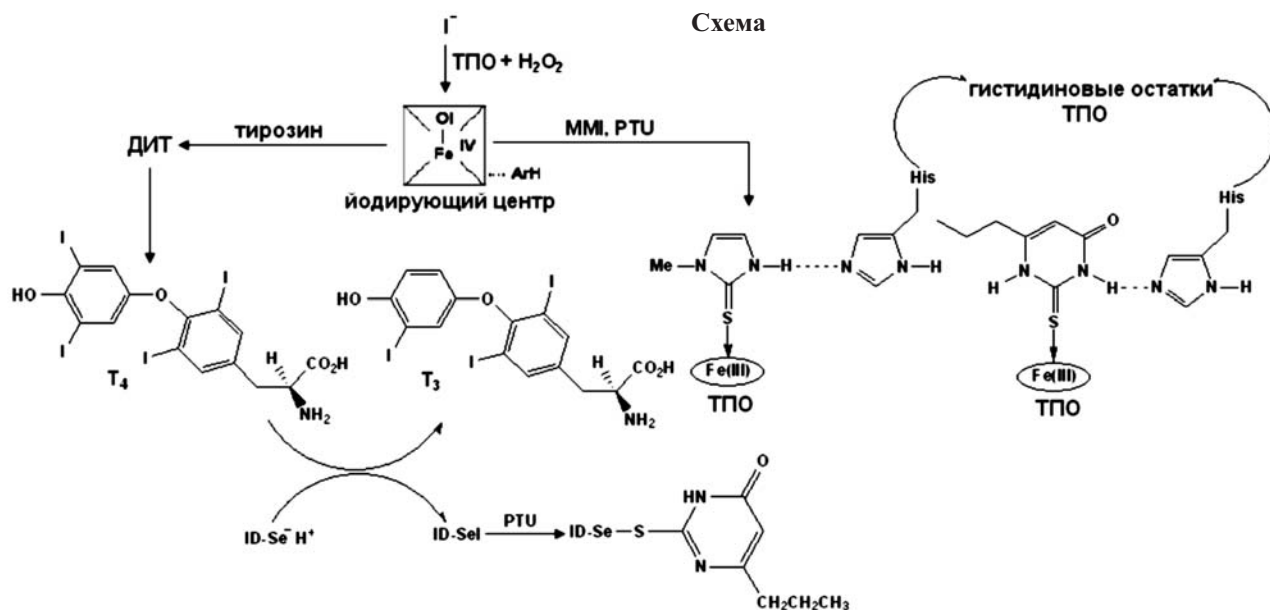
одной из начальных стадий биосинтеза тиреоидных гормонов происходит взаимодействие оксоферрил-порфирин-л-катион-радикала в составе тиреоидной пероксидазы (ТПО) с йодид-ионами с образованием йодирующего центра — FeOI (схема). Последующая йодинация тирозильных остатков до прогормона T₄ осуществляется с его участием. Ингибирование процесса йодирования заключается в конкурентной координации ионом железа (III) тиреопероксидазы молекул тиреостатиков через атом серы.

Процесс монодейодирования T₄ катализируется специфическим селенсодержащим ферментом — йодтирониндеиодиназой (ID-I) [11–13]. Под действием производных 2-тиоурацила (PTU) происходит инактивация ID-I с образованием конечного продукта с селен-сульфидной связью.

Методы идентификации и количественного определения лекарственных препаратов анти tireоидного действия достаточно широко представлены в научной периодике. Все множество используемых методов можно систематизировать и выделить несколько основных групп.

Хроматографические методы анализа

В научной периодике широко представлены различные хроматографические методы определения биологически активных тиоамидов в моче [14–17] и тканях [14, 18–21], том числе методы ГХ-масс-спектрометрии [14, 17, 20], ВЭЖХ-масс-спектрометрии [15, 19], ВЭЖХ-УФ [14, 16, 19]. К этой группе можно отнести быстро развивающиеся методы мицеллярной электрокинетической хроматографии и капиллярного



Предполагаемый механизм синтеза (слева на схеме) гормонов T₄ и T₃ и его ингибирования (справа на схеме) антитиреоидными препаратами (ММІ, РТУ). Инактивация фермента ID-I под действием РТУ (внизу на схеме).

электрофореза (КЭ), которые являются одними из доступных современных высокочувствительных, удобных и экспрессных в исполнении и обработке результатов анализа.

Отличительной чертой хроматографических методов является высокая селективность, воспроизводимость и чувствительность. Методы ВЭЖХ используются для количественного определения в биоматериалах непосредственно после соответствующей обработки и экстракции или после дополнительного химического модифицирования.

В работе [16] представлена простая и экспрессная ВЭЖХ-УФ методика определения антитиреоидного препарата ММІ и его метаболитов: имидазолин-2-тиона, N-метилтиомочевини и N-метилгидантоина в тканях рыбы полосатого данио, после предварительной гомогенизации и твердофазной экстракции. Высокополярные примесные соединения отделялись градиентным элюированием на хроматографической колонке, работавшей в обращенно-фазовом режиме. Коэффициенты удерживания варьируются в диапазоне 1,53 – 5,66. Градуировочная функция линейна в интервале концентраций 0,1 – 30 мкг/мл. Пределы обнаружения составляют для ММІ и имидазолин-2-тиона — 0,4 нг, для МТУ — 0,6 нг, для N-метилгидантоина — 2,6 нг.

Авторами [22] предложена экспрессная ВЭЖХ-УФ методика определения концентрации ММІ в плазме крови пациентов, принимающих препарат. Для анализа использовалась хроматографическая колонка Nuregil ODS (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза: метанол — 0,05 % уксусная кислота (1:99). Детектирование проводили при 252 нм. Методика характеризуется хорошей прецизионностью и воспроизводимостью и

обеспечивает линейность градуировочной функции в диапазоне концентраций 0,1 – 50 мкг/мл.

В работе [23] описана методика определения тиреостатических препаратов ТУ, МТУ, РТУ, 6-фенил-2-тиоурацила и ММІ в плазме крови крупного рогатого скота методом ВЭЖХ-УФ с обращенной фазой после экстракции из плазмы крови этилацетатом. Детектирование проводили при 276 нм для ТУ, МТУ, РТУ, 6-фенил-2-тиоурацила, и при 258 нм — для ММІ. Методика извлечения тиреостатиков (ТУ, 4(6)-метил-2-тиоурацила, ММІ (препарат “Тапазол”), РТУ и 6-фенил-2-тиоурацила) из щитовидной железы крупного рогатого скота, с последующей идентификацией и количественным разделением методами ТСХ и ВЭЖХ изложена в работе [24]. Предварительная очистка проб проводилась на микроколонках Seppak с кислым оксидом алюминия, которые обеспечивают хорошую воспроизводимость и максимальное удаление мешающих примесей (кислого, основного и нейтрального оксида алюминия и флорисила). Идентификацию соединений проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле. Анализ методом ВЭЖХ проводили на колонках С-18. В качестве подвижной фазы выбрана смесь метанол — вода (90:10). УФ-детектирование осуществлялось для всех соединений при длине волны 265 нм, что позволило автоматизировать анализ.

Авторами [25] предложено определение МТУ и РТУ в плазме крови методом ВЭЖХ с хемилюминесцентным детектором в многокомпонентной системе KMnO₄ — H₂SO₄ — HCHO — РТУ(МТУ). Предел обнаружения и минимально определяемая концентрация для обоих препаратов составляют соответственно 0,03 и 0,1 мг/мл.

Усовершенствованная методика определения MMI в плазме крови, а также клинические исследования препарата изложены в публикации [26]. Из плазмы крови препарат экстрагировали последовательной обработкой NaHSO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и смесью CHCl_3 -октанол. Степень извлечения из проб, содержащих 0,2–1,0 мкг/мл MMI, составила 90 %. Аликвоты плазмы далее анализировали методом ВЭЖХ на микроколонках Solbas Silica или Radial Pack Cartridge Silica. Предел обнаружения — 0,02 мкг/мл, воспроизводимость — 4,0–4,6 %. Фармакокинетику препарата изучали у здоровых взрослых и детей, страдающих гипертиреозом. Разделение и идентификация MMI в смешанных кормах и премиксах для крупного рогатого скота методом ТСХ описаны в работе [27]. Качественную идентификацию MMI проводили на силикагеле G60 F254, подвижная фаза — CHCl_3 -BuOH (80:20). Величина R_f составила 0,58. Обнаруживающий реагент — 2,6-дихлорхинон хлоримид. Детектируемые хроматографические пятна элюировали хлороформом. Спектрофотометрическое детектирование проводили при длине волны 418 нм. Порог обнаружения — 25 частей на миллион (ppm).

Высококочувствительная и прецизионная ВЭЖХ методика определения MMI в плазме крови пациентов, страдающих гипертиреозом, разработана авторами [28]. Описанный метод извлечения MMI из плазмы базируется на образовании комплексного соединения метимазола с 2,6-дихлорхинон хлоридиминном, селективно экстрагируемого хлороформом. Длина волны детектирования — 405 нм. Чувствительность методики позволяет определять концентрацию 5 нг в 1 мл плазмы. Мешающего влияния со стороны других соединений не наблюдалось.

Использование тиреостатических препаратов в качестве добавок, увеличивающих массу животных, запрещено Европейским законодательством [29, 30]. Для контроля содержания тиреостатиков в образцах биологических жидкостей животных авторами [31] разработана ВЭЖХ-масс-спектрометрическая методика определения 6-замещенных 2-тиоурацилов и MMI после дериватизации 3-йодобензилбромидом. Использован химический способ ионизации аналита при атмосферном давлении. В качестве внутреннего стандарта был выбран 2-бензил-6-*n*-пропил-2-тиоурацил. Предел обнаружения тиреостатиков 0,1–5,2 мкг/л, минимально определяемые концентрации 2,6–23,2 мкг/л (при допустимом содержании 100 мкг/л в моче). Определение антитиреозидных лекарственных препаратов MMI, TU, MTU, PTU и бензимидазол-2-тиона в щитовидной железе методом ВЭЖХ с масс-спектроскопическим детектором представлено в работе [19]. Подобраны оптимальные условия твердофазной экстракции для важнейших тиреостатических препаратов. Опробованы различные варианты пробоподготовки, условий разделения и параметров колонки. Определяемые компоненты экстрагировали метанолом. После твердофазной экстракции их подвергли дериватизации 7-хлор-4-нитробензо-2-фуразаном.

Предел обнаружения — 20 мкг на 1 кг тканей для всех перечисленных препаратов.

В работе [32] предложен метод количественного определения биологически активных соединений, в частности MMI, методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором с модифицированным индий (III)-гексацианоферратным электродом. Химически модифицированный электрод (ХМЭ) обладает высокой стабильностью и дает единственный набор обратимых четких пиков. Описанный метод характеризуется стабильными результатами. Диапазон линейности градуировочной функции превышает 3 порядка, предел обнаружения для MMI — 1,6 пмоль. Данный ХМЭ может быть применен для определения чистоты антитиреозидных препаратов, а также для определения тион-содержащих соединений методом циклической вольтамперометрии.

Авторы [33] разработали вариант обнаружения MMI в плазме крови методом ВЭЖХ на колонке, заполненной оксидом алюминия (размер зерен — 10 мкм) и с использованием бензамида в качестве внутреннего стандарта. Достаточно низкий предел обнаружения (0,6 нг) позволяет определять концентрации MMI в плазме ниже 0,1 мкг/мл. В ходе исследования воспроизводимости методики была рассчитана величина относительного стандартного отклонения высоты хроматографического пика, которая составила 14 %.

Авторами [34] разработаны оптимальные условия разделения и количественного определения тиреостатиков MMI, PTU и Carb методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-УФ. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и водного раствора фосфатного буфера с pH = 6,86 в объемных отношениях 25:75. Детектирование проводили в максимумах светопоглощения MMI (254 нм), PTU (275 нм) и Carb (292 нм). Градуировочные функции линейны в широком диапазоне концентраций: 0,34–114,17, 0,51–170,23 и 0,56–186,24 мг/л соответственно для MMI ($c_{\min} = 0,29$ мг/л, $s_r = 1,2$ %), PTU ($c_{\min} = 0,26$ мг/л, $s_r = 0,6$ %) и Carb ($c_{\min} = 0,24$ мг/л, $s_r = 0,5$ %). Методика апробирована при анализе образца урины на PTU и Carb. Использовалась предварительная экстракция препаратов из урины этилацетатом. Степень извлечения PTU и Carb составила 70 ± 2 %, пределы обнаружения в моче $s_r = 0,38$ мг/л (PTU) и 0,35 мг/л (Carb). Чувствительность разработанной методики обнаружения находится на уровне чувствительности представленных в литературе ВЭЖХ-УФ методов с использованием дериватизации (0,15 мг/л) [35] и гораздо выше чувствительности с предварительной экстракцией (6,7 мг/л) [18] определяемых компонентов. Более низкие пределы обнаружения (0,025 мг/л) могут быть достигнуты при использовании ВЭЖХ-масс-спектрометрии с применением двойной экстракции и концентрирования [15] или ГХ-масс-спектрометрии [20].

В публикации [36] предложен метод извлечения из мышечной ткани и определения MMI и ряда препаратов, производных 2-тиоурацила, добавление которых в

животный корм запрещено. Мышечная ткань гомогенизирована с водно-ацетонитрильным раствором и отделена с использованием петролейного эфира. Затем водно-ацетонитрильный раствор пропускали через колонку с силикагелем и после удаления растворителя смешивали с N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамидом (дериватизация). Количественное определение проводили методом газовой хроматографии с N-P детектором. В качестве контролирующего метода выбрано сочетание ГХ с масс-спектроскопией. Предел обнаружения ММІ составил 0,05 мкг на 1 г мышечной ткани.

Газохроматографическое определение методом внутреннего стандарта с масс-спектрометрическим детектированием антитиреоидного препарата метимазола в плазме крови после дополнительного химического модифицирования (алкилирование по атому серы) представлено в работе [37]. В качестве алкилирующих агентов использовались бензилхлорид и пентафторбензил бромид. Внутренним стандартом послужил метимазол, меченный дейтерием. При содержании метимазола в плазме 5 нг/мл точность анализа составляла 6 %. Определению метимазола в плазме крови методом газовой хроматографии со специфическим термоионным N-P детектором посвящена работа [38]. Хроматографическая колонка заполнена 10 % Arizeon L и 5 % КОН на Chromosorb W. Предел обнаружения 30 нг/мл плазмы крови.

Двойная дериватизация 1-метилимидазолин-2-тиона и производных 2-тиоурацила использована авторами при анализе тканей животных методом ГХ-МС. В качестве дериватизаторов использованы пентафторбензилбромид и N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид [17].

Экспресс ГХ-МС метод идентификации и количественного определения тиреостатиков, производных 2-тиоурацила, в молоке и моче разработан авторами [14]. После предварительного твердофазного извлечения проведена дериватизация препаратов пентафторбензилбромидом и N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамидом в сильно основной среде. В качестве внутреннего стандарта использован диметилтиоурацил. Предел обнаружения составляет 0,0016 мкг/г.

Авторами [39] оптимизированы условия ВЭЖХ определения РТУ с УФ ($\lambda = 214$ нм) детектированием в сыворотке крови. Стандартная экстракционная процедура [40, 41] модифицирована добавкой 6 мл дихлорметана к 1 мл сыворотки. Сухой остаток после удаления экстрагента растворяли в подвижной фазе (1:1, метанол — вода) и хроматографировали. Градуировочная функция линейна в области 0,312 – 40,0 мкг/мл. Предел обнаружения РТУ, рассчитанный с использованием метода добавок, составляет 0,156 – 0,625 мкг/мл.

Количественное определение метимазола, а также тиреостатиков — производных 2-тиоурацила (4-метил-2-тиоурацила, 4-пропил-2-тиоурацила и 4-фенил-2-тиоурацила) в животном корме методом мицеллярно-электрокинетической хроматографии представ-

лено в работе [42]. Извлечение компонентов проводили экстракцией смесью $\text{CH}_3\text{OH} : 1 \text{ M NaOH} (80:20)$. Анализ проводился при напряжении 15 кВ и температуре 23 °С; ведущий электролит содержал 40 ммоль/л NaH_2PO_4 , 50 ммоль/л натрий додецилсульфата и 15 ммоль/л Tween 20 при pH 9. Пики появлялись в интервале 2,25 – 5,2 мин. Градуировочный график линейен в диапазоне 20 – 200 мкг/мл. Пределы обнаружения соединений в экстрактах обогащенного корма находятся в интервале 0,25 – 0,4 мкг/мл, что соответствует 0,6 – 1,0 мкг препаратов в 1 г корма. Воспроизводимость хроматографических пиков составляла около 4 % для концентрации 20 мкг/мл.

Капиллярный электрофорез благодаря высокой чувствительности, селективности и экспрессности исполнения и обработки результатов анализа является одним из часто применяемых методов количественного определения органических молекул и катионов, как в стандартном [43], так и в модифицированном вариантах [44 – 48]. Капиллярный электрофорез является относительно молодым, непрерывно совершенствующимся методом разделения и анализа [49].

Метод зонного капиллярного электрофореза, один из современных методов анализа биологически активных соединений [43] и фармацевтических препаратов [50], был успешно применен авторами [51] при анализе таблеток мерказолил, лекарственной формы 1-метилимидазолин-2-тиона. Правильность результатов контролировали фармакопейным методом, титруя мерказолил стандартным раствором NaOH в присутствии избытка AgNO_3 [52]. При поиске условий электрофоретического определения ММІ установлены оптические характеристики препарата в УФ области электронного спектра поглощения. Положение полосы поглощения и ее интенсивность ($\lambda_{\text{max}} = 253,7$ нм, $\lg \epsilon = 4,16$) позволили применить прямое детектирование препарата при разработке методики. При pH 4,5 были получены наиболее узкие, хорошо сформированные хроматографические пики. Предлагаемая методика отличается хорошей воспроизводимостью и правильностью, проста и экспрессна. Она позволяет оценить содержание вещества в диапазоне концентраций $1,5 \cdot 10^{-4} - 1,8 \cdot 10^{-3}$ М ($c_{\text{min}} = 4,6 \cdot 10^{-5}$ М, $s_r = 0,025$), отвечает требованиям, предъявляемым к методикам анализа лекарственных препаратов и биообъектов.

Авторами [53] подобраны оптимальные условия разделения и количественного определения (боратный буферный раствор pH = 9,18, напряжение 20 кВ) антитиреоидных препаратов — 6-R-2-тиоурацилов, где R=H (TU), CH_3 (MTU), $n\text{-C}_3\text{H}_7$ (PTU) на кварцевом капилляре 60 см × 75 мкм методом капиллярного зонного электрофореза. Методика позволяет оценить содержание веществ в диапазонах концентраций 1,3 – 103, 1,4 – 114 и 1,7 – 136 мкг/мл, с пределами обнаружения 0,93, 0,73 и 0,86 мкг/мл для TU, MTU, PTU соответственно. В этой же работе представлена методика газохроматографического-масс-спектрометрического определения РТУ с линейным диапазоном concentra-

ций 10–50 мкг/мл и пределом обнаружения 5,22 мкг/мл.

Вольтамперометрические методы анализа

Ко второй группе можно отнести вольтамперометрические методы определения тиреостатических лекарственных препаратов. Основные преимущества этих методов — высокая чувствительность, особенно при использовании ртутного капаящего электрода (полярография), и точность.

В работах [54, 55] описана методика количественного определения ММІ в лекарственной форме методом дифференциально-импульсной полярографии. Для определения ММІ в качестве электролита использовался $5,0 \cdot 10^{-2}$ М раствор LiClO_4 . Подобраны оптимальные условия полярографирования: начальный потенциал –0,9 В (относительно хлоридсеребряного электрода), 0,08 мВ — амплитуда импульса, 2 мВ/с — интервал сканирования и ртутная капля среднего размера. Калибровочная функция линейна в интервале $1,0 \cdot 10^{-7}$ – $8,0 \cdot 10^{-5}$ М, предел обнаружения $2,2 \cdot 10^{-9}$ М. Определению не мешают добавки и наполнители, обычно присутствующие в таблетках.

В отечественных журналах также опубликованы методики полярографического [56, 57] определения препаратов антитиреоидного действия. В [56] предложена методика количественного определения ММІ в таблетках препарата мерказолил методом анодной полярографии в растворе 0,1 н NaOH в 75 % EtOH при 25 °С. При этом различные наполнители не мешают определению.

В работе [57] изложена методика полярографического определения ММІ в присутствии $\text{HCO}_2\text{H}-\text{HCl}$ при 25 °С в диапазоне концентраций $1,0 \cdot 10^{-5}$ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Относительная погрешность составляет 0,1–1,32 %. Необходимое время анализа — 15–20 мин.

Публикации [58, 59] посвящены исследованию протолитических свойств ММІ и Carb. Методом спектрофотометрии определено значение константы диссоциации ММІ: $\text{pK}_a(\text{ММІ}) = 12,0 \pm 0,2$. При $\text{pH} < 6$ ММІ существует только в тиоамидной таутомерной форме, а при $\text{pH} > 6$ появляется некоторая часть тиоиминольной формы. Кроме того, предложены различные варианты определения субстанций в таблетках методами переменного-токовой полярографии и вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала. Анодные волны обоих соединений на ртутном электроде отвечают образованию солей ртути. Анализ обоих препаратов проводили в присутствии 0,1 М H_2SO_4 , содержащей 10 % этанола. Для ММІ также подобраны условия определения в присутствии боратного буферного раствора (pH 11,2). В этих условиях молекула Carb в результате гидролиза и последующей стадии декарбоксилирования превращается в молекулу ММІ. Диапазон линейности градуировочных функций составил 20–160 мкг/см³. Пределы обнаружения для переменного-токовой полярографии и вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала составляют соответственно $4,0 \cdot 10^{-5}$ М и $1,0 \cdot 10^{-5}$ М.

Авторами [60] разработан метод вольтамперометрического определения ММІ. Электрохимические свойства ММІ изучены с использованием циклической вольтамперометрии в интервале pH от 1,0 до 13,0 с применением ртутного и золотого электродов. Анодные процессы на ртутном электроде ведут к образованию соли ртути или комплекса метимазола со ртутью. На твердом электроде процесс окисления ММІ контролируется скоростью его диффузии в приэлектродное пространство. Градуировочный график линейен в интервале $5 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ М.

Методики количественного полярографического определения РТУ описаны в работах [54, 61]. Преимуществом большинства из них является возможность определения аналита без предварительного отделения наполнителей, присутствующих в лекарственных формах.

Спектрофотометрические методы анализа

В третью группу мы выделили спектрофотометрические методы количественного определения тиреостатических препаратов. Также к этой группе можно отнести кинетические и проточно-инжекционный (ПИА) методы анализа.

В основе методики, изложенной в работе [62], лежит реакция образования комплексного соединения метимазола и карбимазола с Pd(II) в 0,05 М HCl . Длина волны детектирования — 325 нм. Линейная зависимость между оптической плотностью и концентрацией исследуемых соединений наблюдается в интервале $1 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ М. Методика применима для анализа фармацевтических препаратов, содержащих субстанции, а также для определения метимазола и карбимазола в биологических жидкостях.

Описана методика [63] проточно-инжекционного определения метимазола и карбимазола с хемиллюминесцентным детектором, базирующаяся на ингибирующем действии последних на катализируемую Cu(II) хемиллюминесцентную реакцию люминола с H_2O_2 . Градуировочные функции линейны в диапазонах 2–100 и 3–120 мг/л для метимазола и карбимазола соответственно. Величины относительного стандартного отклонения для концентрации препаратов 50 мг/л ($n = 10$) составляют 1,9 % (ММІ), 2,1 % (Carb). Обычные наполнители, присутствующие в таблетках, не мешают определению.

Авторами [64] предложен кинетический метод определения антитиреоидных препаратов карбимазола, метимазола и пропильтиоурацила, основанный на их ингибировании каталитического действия Pd(II) в реакции между пиронином G и гипофосфит-ионами. Протекание реакции контролировали спектрофотометрически при $\lambda = 548$ нм. Линейность градуировочного графика соблюдается в интервалах концентраций 0,04–0,50, 0,04–0,70, 0,08–1,00 мкг/мл для метимазола, карбимазола, пропильтиоурацила соответственно. Метод позволяет определять перечисленные соединения в биообъектах, животных кормах и фармацевтических препаратах.

Спектрофотометрический метод количественного определения метимазола в воде и готовых лекарственных

ных формах, основанный на образовании комплекса желтого цвета с PdCl_2 ($\lambda_{\text{max}} = 325$ нм) при pH 2,13, предлагают авторы [65]. Линейная зависимость величины абсорбции от концентрации метимазола сохраняется в пределах 2,5 – 50 мкмоль/л. Предел обнаружения и относительное стандартное отклонение составляют соответственно 0,28 мкг/мл и 1,26 – 3,10 %.

Польскими исследователями [66] разработана спектрофотометрическая методика определения метилтиоурацила и метимазола, основанная на индуцированной иод-азидной реакции. В ходе анализа измеряли оптическую плотность йодогалогенид-иона при 350 нм, генерированного в системе $\text{NaN}_3\text{-KI-HCl}$ (pH 5,0 – 5,6), в сравнении с холостым опытом. Предлагаемая методика отличается хорошей воспроизводимостью и правильностью, проста и экспрессна. Она позволяет оценить содержание веществ в диапазоне концентраций 15 – 90 нг для метилтиоурацила и 150 – 900 нг для метимазола и может успешно применяться для определения препаратов в таблетках.

Определению производных 2-меркаптопиридина и 2-меркаптопиримидина (в том числе PTU, MTU, TU) кинетическим методом, а также методом тонкослойной хроматографии с использованием иод-азидной реакции посвящены работы [67, 68]. Методы основаны на индуцировании тиокарбамидами окислительно-восстановительной реакции: $2\text{NaN}_3 + \text{I}_2 = 2\text{NaI} + 3\text{N}_2$. Минимальные количества и концентрации тиоамидов, определяемые методом ТСХ и кинетическим методом, составляют соответственно 1 – 60 пмоль и 10^{-6} – 10^{-5} моль/л.

Методика определения метимазола, основанная на спектрофотометрическом определении продукта реакции тиоамида с *n*-хинонхлоримидом в изопропиловом спирте (универсальный буферный раствор, pH 11,0), была запатентована отечественными учеными [69].

В работе [70] предложен спектрофотометрический метод определения метимазола в плазме крови. Препарат экстрагировали из плазмы смесью хлороформа, содержащей 2 % изобутилового спирта, и после удаления растворителя осадок растворяли в воде. Затем к водному раствору добавляли 2 % раствор аммиака в ацетоне и $4,5 \cdot 10^{-4}$ М раствор 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона в ацетоне. Через 5 мин измеряли оптическую плотность раствора при 435 нм. Зависимость абсорбция — концентрация метимазола линейна в интервале 0,4 – 4 мкг/мл. При смешивании чистого 1-метил-имидазолин-2-тиона с 2,3-дихлор-1,4-нафтохиноном и раствором аммиака в спирте образуется продукт реакции красного цвета, имеющий брутто-формулу $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ ($t_{\text{пл}} = 196$ °С).

Авторами [71] разработана методика определения метимазола в сыворотке крови. 1-Метилимидазолин-2-тион извлекают экстракцией этиловым спиртом и вводят в реакцию с 2,6-дихлорхинон хлоримидом в метаноле; продукт реакции экстрагируют хлороформом и определяют спектрофотометрически при 439 нм.

Методика количественного определения метимазола, предложенная в работе [72], основана на измерении абсорбции при длине волны 410 нм продукта реакции метимазола с 2,6-дихлорхинон хлоримидом. Желтая окраска образующегося комплекса полностью развивается в течение 5 мин и остается стабильной в течение 60 мин. Линейность градуировочного графика наблюдается в отрезке концентраций 1 – 8 мкг/мл, относительное стандартное отклонение равно 1,25 %. Методика применима для анализа лекарственных форм. В качестве контролирующего был выбран титриметрический метод анализа.

В публикации [73] изложена спектрофотометрическая методика определения метимазола, основанная на образовании окрашенных продуктов реакции последнего с 2 реагентами — $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$ и $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ при pH 2,8 – 4,3. Длина волны поглощения — 580 нм. Основной закон светопоглощения соблюдается в интервалах концентраций 15 – 35 и 5 – 30 мкг/мл; чувствительность 0,06 и 0,07 мкг/мл соответственно для 2 реагентов. Относительное стандартное отклонение определения метимазола в таблетках и в растворе для инъекций составило 1,8 – 2,3 %.

Титриметрические и электротитриметрические методы анализа

К четвертой группе мы отнесли титриметрические и электротитриметрические (потенциометрия, кулонометрия, кондуктометрия), методы количественного определения анти тиреоидных препаратов.

Определению 1-метилимидазолин-2-тиона в таблетках препарата тиремазол методом потенциометрического титрования молекулярным йодом в щелочной среде посвящена работа турецких авторов [74]. Интервал определяемых концентраций метимазола составил 10 – 500 мкмоль. Стехиометрическое протекание реакции обеспечивают концентрации гидроксида натрия, лежащие в диапазоне 0,75 – 1,25 моль/л. Минимально определяемая концентрация метимазола — 0,5 мкмоль/л. Относительное стандартное отклонение составило 0,81 %. Методика позволяет определять действующее вещество в готовых лекарственных формах без предварительного отделения наполнителей.

Количественное определение серусодержащих препаратов в таблетках, в т.ч. метимазола, методом осциллоскопического потенциометрического титрования представлено в работе [75]. Навеску таблеток тщательно измельчали и растворяли в смеси 5 мл 1 М NaOH и 1 мл 30 % раствора H_2O_2 . Далее исследуемый раствор нагревали и выдерживали при комнатной температуре для протекания процессов гидролиза и окисления. Затем вновь нагревали для удаления избытка H_2O_2 . После этого раствор охладил, для нейтрализации избытка щелочи добавили HNO_3 и после этого обработали 2,5 мл раствора NH_4OAc . Полученный раствор перенесли в химический стакан емкостью 100 мл, в который добавили соответствующее количество NH_4OAc , безводного $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и 2 капли раствора K_2CrO_4 . Анализируемую смесь титровали раствором BaCl_2 . При-

существующие в таблетках добавки и примеси не мешают определению.

Методика кондуктометрического определения метимазола в таблетках, предложенная в работе [76], основана на добавлении к исследуемому раствору избытка AgNO_3 , выделившуюся HNO_3 оттитровывают NaOH кондуктометрически. Методика характеризуется высокой точностью и воспроизводимостью и может быть использована для рутинных определений.

Вариант кулонометрического определения 1-метилимидазолин-2-тиона, основанный на титровании соединения электрогенерированными хлором и бромом в кислых средах описан в [77]. В работе обсуждается характер электрохимического взаимодействия метимазола с титрантами. Установлено, что скорость электрохимической реакции хлорирования выше скорости бромирования, однако, это никак не сказывается на точности результатов. Предлагаемая методика отличается хорошей прецизионностью, правильностью и позволяет определять микрограммовые количества препарата (2 – 20 мкг).

В отечественных работах [78, 79] предложены различные варианты определения метимазола методом меркуриметрического титрования с дифенилкарбазоном (рН 4,0 – 4,2) и азокрасителем теофилидином в качестве индикаторов.

Методика потенциометрического определения тиоамидов, катионных ПАВ и галогенид ионов с использованием Ag-Ag дисульфидного электрода представлена в работе [80]. Метимазол и пропилигиоурацил оттитровывали раствором 0,01 М $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ в среде боратного буферного раствора (0,025 М).

Потенциометрическое определение тиреостатика мерказолила и цитостатического препарата меркаптопурина в таблетках описывается в публикации [81]. Навеску препарата “Мерказолил” растворяли в воде, затем последовательно обрабатывали растворами NH_4CNS и NaOAc , и оттитровывали раствором CuSO_4 , при этом 1 мл 0,1 М раствора CuSO_4 соответствует 11,4 мг метимазола.

Титрование 1-метилимидазолин-2-тиона, слабой органической кислоты, раствором NaOH с кондуктометрическим фиксированием точки эквивалентности изложено авторами [82]. Методика может быть предложена для рутинных определений на стадии контроля качества.

Вариант прямого потенциометрического титрования метимазола (при рН 5,6) и метилтиоурацила (при рН 11,0) раствором CuSO_4 с использованием медь-селективного электрода предлагает автор в работе [83]. Стандартное отклонение для определения субстанций в таблетках и драже составило 0,54 – 1,87.

Методы потенциометрического и кулонометрического титрования 6-*n*-пропил-2-тиоурацила молекулярным йодом в нейтральных и щелочных средах (индикатор — крахмал), представлены в работе [84]. Диапазон определяемых количеств вещества составил 0,125 – 0,5 ммоль в среде 1,5 – 2,5 М NaOH . Разработанный метод рекомендуется для проведения рутин-

ных определений и характеризуется коротким временем анализа, точностью и доступностью реагентов.

Хронология представленных в обзоре методов разделения и количественного определения антигиперлипидных препаратов — меркаптопроизводных пиримидина и имидазола свидетельствует о преобладании в современном фармацевтическом анализе хроматографических методов, включая электрокинетическую хроматографию и зонный капиллярный электрофорез. Практическое приложение методов связано с пробоподготовкой образцов и химическим модифицированием молекул препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. C. Raby, J. F. Lagorce, A. C. Jambut-Absil, et al., *Endocrinology*, **126**, 1683 – 1691 (1990).
2. В. М. Кеттайл, Р. А. Арки, *Патофизиология эндокринной системы*, Бином, Москва (2001), сс. 93 – 95.
3. J. Sun, C. Zheng, X. Xiao, et al., *Electroanalysis*, **17**, 1675 – 1680 (2005).
4. H. B. Dunford, *Heme Peroxidases*, Wiley-VCH, New York (1999).
5. G. Furtmüller, M. Zederbauer, W. Jantschko, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **445**, 199 – 213 (2006).
6. A. Taurog, in: *The Thyroid*, L. E. Braverman, R. D. Utiger (eds.), *Werner's JB Lippincott*, Philadelphia (1991), pp. 51 – 97.
7. В. П. Мартинович, О. В. Свиридов, *Хим.-фарм. журн.*, **40**(9), 45 – 49 (2006).
8. Y. Ma and C. J. Sih, *Tetrahedron Lett.*, **40**(52), 9211 – 9214 (1999).
9. E. Alder, K. Holmberg, and L.-O. Ryrfors, *Acta Chem. Scand.*, **28**, 883 – 887 (1974).
10. M. A. Lasar, *Endokrine Rev.*, **14**, 184 – 197 (1993).
11. D. Behne, A. Kyriakopoulos, H. Meinhold, et al., *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**(3), 1143 – 1149 (1990).
12. M. J. Berry, J. D. Kieffer, J. W. Harney, et al., *J. Biol. Chem.*, **266**(22), 14155 – 14158 (1991).
13. J. Köhrle, *Methods Enzymol.*, **347**, 125 – 167 (2002).
14. Q. H. Zou, Y. Liu, and M. X. Xie, *Anal. Chim. Acta*, **551**, 184 – 191 (2005).
15. W. J. Blanchflower, P. J. Hughes, A. Cannavan, et al., *Analyst*, **122**(9), 967 – 972 (1997).
16. L. Hollosi, A. Kettrup, and K. W. Schramm, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **36**(4), 921 – 924 (2004).
17. L. Zhang, Y. Liu, M. X. Xie, et al., *J. Chromatogr. A*, **1074**, 1 – 7 (2005).
18. C. Sanchez-Pedreno, M. I. Albero, M. S. Garcia, et al., *Anal. Chim. Acta*, **308**, 457 – 461 (1995).
19. K. De Wasch, H. F. Be Brabander, S. Impens, et al., *J. Chromatogr. A*, **912**(2), 311 – 317 (2001).
20. P. Batjoens, H. F. Be Brabander, and K. De Wasch, *J. Chromatogr. A*, **750**(1 – 2), 105 – 114 (1996).
21. R. K. Buick, C. Barry, I. M. Traynor, et al., *J. Chromatogr. B*, **720**(1 – 2), 71 – 79 (1998).
22. Z. Wang, L.-M. Zhang; Z.-W. Yang, et al., *Yaoxue Fuwu Yu Yanjiu*, **2**(2), 92 – 93 (2002).
23. G. Moretti, R. Betto, P. Cammarata, et al., *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **616**(2), 291 – 296 (1993).
24. C. F. Escarpenter and R. D. Hernandez, *Anales de Bromatologia*, **42**(2), 337 – 344 (1990).
25. Y. Wei, Z. J. Zhang, Y. T. Zhang, and Y.-H. Sun, *J. Chromatogr. B*, **854**(1 – 2), 239 – 244 (2007).
26. O. Akimasa, Y. Kohichi, I. Fumie, et al., *Nippon Naibunpi Gakkaishi*, **60**(8), 985 – 994 (1984).

27. C. G. Martin and G. G. Cuevas, *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie: Ganadera* (Spain), **15**, 111 – 118 (1982).
28. A. Meulemans, C. Manuel, C. Ferriere, et al., *J. Liq. Chromatogr.*, **3**(2), 287 – 298 (1980).
29. Council of the European Communities Decision 602/1981/EC, *Off. J. Eur. Commun.*, L 222/32.
30. Council of the European Communities Decision 649/1986/EC, *Off. J. Eur. Commun.* L 275/36.
31. G. Pinel, E. Bichon, K. Pouponneau, et al., *J. Chromatogr. A.*, **1085**(2), 247 – 252 (2005).
32. Z. S. Sun, W. L. Zhang, Wen; Q. Wen-yu, et al., *Anal. Chim. Acta*, **386**(1 – 2), 21 – 30 (1999).
33. G. G. Skellern, B. I. Knight, and J. B. Stenlake, *J. Chromatogr.*, **124**(2), 405 – 410 (1976).
34. М. С. Черновьянц, А. О. Долинкин, Е. В. Хохлов, *Журн. аналит. химии*, (2008).
35. K. Ku'smirek and E. Bald, *Talanta*, **71**(5), 2121 – 2125 (2007).
36. J. W. Pensabene, S. J. Lehotay, and W. Fiddler, *J. Chromatogr. Sci.*, **39**(5), 195 – 199 (2001).
37. S. Floberg, K. Lanbeck, and B. Lindstroem, *J. Chromatogr.*, **182**(1), 63 – 70 (1980).
38. M. R. Bending and D. Stevenson, *J. Chromatogr.*, **154**(2), 267 – 271 (1978).
39. C. G. Duarte, A. C. M. Polizello, A. I. Assis-Pandochi, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **23**(1), 237 – 241 (2000).
40. M. T. Rosseel and R. A. Lefebvre, *J. Chromatogr. A*, **507**, 247 – 251 (1990).
41. G. R. Cannell and J. P. Williams, *J. Chromatogr.*, **564**, 311 – 314 (1991).
42. J. Esteve-Romero, I. Escrig-Tena, and E. F. Simo-Alfonso, *Analyst* (Cambridge, United Kingdom), **124**(2), 125 – 128 (1999).
43. D. Perrett, *Ann. Clin. Biochem.*, **36**(2), 133 – 150 (1999).
44. E. R. Mardis, *J. Biomolec. Techn.*, **10**, 137 (1999).
45. P. Britz-McKibbin and D. D. Y. Chen, *Anal. Chem.*, **72**(6), 1242 – 1252 (2000).
46. H. Zhou, A. W. Miller, Z. Susic, et al., *Anal. Chem.*, **72**, 1045 – 1052 (2000).
47. G. Gübitz and M. G. Schmid, *Electrophoresis*, **21**(18), 4112 – 4135 (2000).
48. С. А. Рожнова, М. В. Гаврилин, С. П. Сенченко и др., *Хим.-фарм. журн.*, **41**(8), 46 – 48 (2007).
49. Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев, *Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза "Капель"*, Вѳда, Санкт-Петербург (2006).
50. Т. Г. Морзунова, *Хим.-фарм. журн.*, **40**(3), 39 – 52 (2006).
51. М. С. Черновьянц, Е. В. Хохлов, Е. О. Лыкова и др., *Журн. аналит. химии*, **62**(3), 295 – 297 (2007).
52. *Государственная фармакопѳя СССР*, 10 изд., Медицина, Москва (1968), с. 410.
53. М. С. Черновьянц, А. О. Долинкин, И. В. Браславская, *Журн. аналит. химии*, **63**(9), 930 – 934 (2008).
54. I. K. Kim, H. J. Chun, and S. S. Han, *J. Korean Chem. Soc.*, **48**(2), 137 – 143 (2004).
55. I. K. Kim, H. J. Chun, and S. H. Lim, *Anal. Sci. Technol.*, **8**(1), 17 – 23 (1995).
56. А. П. Арзамасцев, Н. Б. Григорьев, С. К. Ордабаева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **26**(9 – 10), 126 – 127 (1992).
57. М. И. Лебедева, Р. В. Борисова, Б. И. Исаева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **13**(12), 89 – 91 (1979).
58. F. Zbigniew and W. Malgorzata, *Acta Polon. Pharm.*, **48**(3 – 4), 23 – 26 (1991).
59. F. Zbigniew and P. Zuman, *Anal. Lett.*, **23**(7), 1213 – 1223 (1990).
60. S. Katarzyna and F. Zbigniew, *Chem. Analit.*, **42**(3), 425 – 433 (1997).
61. J. M. Lopez and P. C. Gonzalez, *Chem. Abstr.*, **95**, 175874b (1981).
62. C. Sanchez-Pedreno, M. I. Albero, M. S. Garcia, et al., *Anal. Chim. Acta*, **308**(1 – 3), 457 – 461 (1995).
63. E. Anastasios, T. D. Paraskevas, N. Maria, et al., *Anal. Chim. Acta*, **505**(1), 129 (2004).
64. G. M. Soledad, M. I. Albero, and C. Sanchez-Pedreno, *Analyst* (Cambridge, United Kingdom), **120**(1), 129 – 133 (1995).
65. T. Jovanovic, B. Stankovic, and K. Zagorka, *Pharmazie*, **47**(10), 798 – 799 (1992).
66. W. Ciesielski, *Acta Polon. Pharm.*, **44**(2), 202 – 205 (1987).
67. R. Zakrzewski, *J. Chromatogr. B*, **824**, 222 – 228 (2005).
68. J. Kurzawa, A. Wisniewska, and K. Janowicz, *Anal. Chim. Acta*, **567**(2), 286 – 292 (2006).
69. Патент СССР № 83 – 3611223 (1984).
70. N. Gallo, P. Bianco, and R. Tapino, *Minerva Med.*, **74**(16), 875 – 877 (1983).
71. И. Биедрис, В. Рудзитис, *Сб. научн. статей "Клинические и параклинические параллели при изучении соединительной ткани"*, РМИ, Рига (1981), сс. 4 – 7.
72. R. Gatti, V. Cavrini, B. Balboni, et al., *Farmaco, Edizione Pratica*, **40**(3), 71 – 76 (1985).
73. M. Jaksevac-Miksa, V. Honkonyi, and V. Karas-Gasparesc, *Acta Pharm. Jugoslavica*, **29**(2), 91 – 96 (1979).
74. M. Aslanoglu and N. Peker, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**(5), 1143 – 1147 (2003).
75. Y. Zhao and S. Zhang, *Lihua Jianyan, Huaxue Fence*, **30**(6), 353, 5 (1994).
76. A. Berka, K. Velasevic, and K. Nikolic, *Pharmazie*, **44**(7), 499 (1989).
77. K. Nikolic and K. Velasevic, *Pharmazie*, **42**(10), 698 (1987).
78. Л. М. Бажина, Г. И. Кудинов, Г. А. Камельянова, *Авнал. ВИНИТИ*, (ВИНИТИ 1415 – 83), Москва (1983).
79. А. М. Алиев, Б. М. Гусейнов, *Фармация*, **32**(5), 80 – 82 (1983).
80. S. Pinzauti, G. Papeschi, and E. La Porta, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1**(1), 47 – 53 (1983).
81. Л. Г. Гейн, В. К. Рубцов, З. А. Сумбайкина, *Фармация*, **3**, 70 (1975).
82. H. Y. Aboul-Enein, H. M. El-Fatraty, and E. A. Lotfi, *Pharmazie*, **35**(10), 604 – 605 (1980).
83. L. W. Przyborowski, *Abstrs. of the Ion-Selective Electrodes Conference*, (1978), pp. 519 – 522.
84. W. Ciesielski and R. Zakrzewski, *Analyst*, **122**, 491 – 494 (1997).

Поступила 24.07.08

ANALYSIS OF HETEROAROMATIC THIOAMIDES USED AS THYROID DRUGS (A REVIEW)

A. O. Dolinkin and M. S. Chernov'yants

Analytical Chemistry Department, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Methods for the identification and quantitative determination of thyroid drugs, including imidazoline-2-thione and uracil-2-thione derivatives, which are widely used in pharmacology and clinical practice are reviewed. The attention is focused on the sample preparation (solid-phase and liquid – liquid extraction from biological samples) and chemical modification of drug molecules. A hypothetical model of the inhibitory action of thyroid drugs on the biosynthesis of thyroid hormones is presented. Analytical characteristics of the particular procedures used for determining thyreostatic compounds considered in this review can be applied in the quality control stage in drug production.

Key words: Heteroaromatic thioamides; imidazoline and uracil derivatives; hypothetical model of thyroid drug action; chromatographic, voltammetric, and titrimetric methods of drug determination; chemical modification