

9. Lobanova I. E., Yakimova Yu. L. Antimikrobnaya aktivnost' maslyanykh i etanol'nykh ekstraktov *Astragalus glycyphyllos* [The antimicrobial activity of oil and ethanol extracts of *Astragalus Glycyphyllos*]. *Vestnik Novosibirskogo Gosudarstvennogo Universiteta* [Bulletin of Novosibirsk State University], 2012, vol. 10, no. 2, pp. 79–83.
10. Narantsetseg Zh., Solongo Kh., Ambarga M., Chimedragchaa Ch. Antioksidantnyy effekt vodnogo nastoya astragala molochno-belogo [Antioxidant activity of *Astragalus galactatis* water extract]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)* [Siberian Journal of Medicine (Irkutsk)], 2014, vol. 124, no. 1, pp. 103–105.
11. Nikolaeva I. G. Razrabotka i standartizatsiya sredstv rastitel'nogo proiskhozhdeniya, obladayushchikh adaptogennoy aktivnost'yu. Avtoreferat dissertatsii doktora farmatsevticheskikh nauk [Development and standardization of agents of plant origin, possessing adaptogenic activity. Abstract of thesis of Doctor of Pharmaceutical Sciences]. Ulan-Ude, 2012, 49 p.
12. Pisarev D. I., Martynova N. A., Netebenko N. N., Novikov O. O., Sorokopudov V. N. Saponiny i ikh opredelenie v kornevishchakh aralii man'chzhurskoy v usloviyakh Belgorodskoy oblasti [Saponins and their definition in rhizomes of Manchurian aralia in the conditions of the Belgorod region]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of plant raw material], 2009, no. 4, pp. 197–198.
13. Sergalieva M. U., Yasenyavskaya A. L. Antioksidantnye i immunotropnye svoystva ekstrakta travy *Astragala lis'ego* (*Astragalus vulpinus* Willd.) [Antioxidant and immunotropic properties of extract of the grass of *Astragalus vulpinus* Willd.]. *Materialy IV Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Materials of the 4th All-Russian Scientific and Practical Conference (Saint Petersburg, 9-10 November 2016)]. Saint Petersburg, 2016, pp. 169–171.
14. Sergalieva M. U., Mazhitova M. V., Samotrueva M. A. Biologicheskaya aktivnost' ekstraktov rasteniy roda *Astragalus* [Biological activity of extracts of plants of the genus *Astragalus*]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education], 2015, no. 5. Available at: <http://www.science-education.ru/128-21809> (accessed 28 September 2015).
15. Sergalieva M. U., Samotrueva M. A., Mazhitova M. V. Soderzhanie dubil'nykh veshchestv v trave *Astragala lis'ego* (*Astragalus vulpinus* Willd.) [Content of tannins in a grass of *Astragalus vulpinus* Willd.]. *Materialy Zaochnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem* [Materials of the Correspondence Scientific and Practical Conference with international participation]. Astrakhan, 2016, pp. 192–194.
16. Sergalieva M. U., Mazhitova M. V., Samotrueva M. A. Rasteniya roda *Astragal*: perspektivy primeneniya v farmatsii [Plants of the genus *Astragalus*: prospects of application in pharmacy]. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal* [Astrakhan Medical Journal], 2015, vol. 10, no. 2, pp. 17–31.
17. Toropova A. A., Lemza S. V., Azhunova T. A., Khabaeva O. V. Opredelenie antioksidantnoy aktivnosti ekstrakta sukhogo *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge v fermentnykh test-sistemakh [Determination of antioxidant activity of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge dry extract in enzyme assays]. *Vestnik Buryatskogo Gosudarstvennogo Universiteta* [Bulletin of the Buryat State University], 2013, no. 12, pp. 24–27.
18. Turtueva T. A., Nikolaeva G. G., Gulyaev S. M., Zhalsanov Yu. V. Aminokislotnyy sostav korney *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bunge [Amino-acid composition of *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bunge roots]. *Vestnik Buryatskogo Gosudarstvennogo Universiteta* [Bulletin of the Buryat State University], 2013, no. 12, pp. 75–77.
19. *Khimicheskyy analiz lekarstvennykh rasteniy: Ucheb. posobie dlya farmatsevticheskikh vuzov* [Chemical analysis of herbs: Manual for pharmaceutical higher education institutions]. E. Ya. Ladygina, L. N. Safronich, V. E. Otryashenkova, I. A. Balandina, N. I. Grinkevich, A. A. Sorokina, I. N. Sokol'skiy, V. I. Glyzin, L. M. Molodozhnikova, Yu. S. Mitin, I. A. Samylina, V. A. Ermakova / Ed. N. I. Grinkevich, L. N. Safronich, Moscow, Vysshaya shkola [Higher school], 1983, 176 p.
20. Khlebtsova E. B., Samotrueva M. A., Magomedov M. M., Iglina E. M., Tyrkov A. G., Kondratenko E. I. Immunotropnye svoystva flavonoidov lofanta anisovogo [Immunotropic properties of Giant Hyssop (*Lophanthus Anisatus*) flavonoids]. *Farmatsiya* [Pharmacy], 2012, no. 3, pp. 46–48.
21. Khobrakova V. B., Olennikov D. N. Immunomoduliruyushchie svoystva rastitel'nykh glyukanov pri eksperimental'noy immunodepressii [Immunomodulating properties of the plant glucans at experimental immunosuppression]. *Byulleten' Vostochno-sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN* [Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences], 2012, no. 6 (88), pp. 103–105.
22. Tsymbal M. V., Grechko A. T., Antonov Yu. K. Ispol'zovanie biologicheskii aktivnykh veshchestv i adaptogenov v khirurgii povrezhdeniy i opukholey dvigatel'nogo apparata [Use of biologically active agents and adaptogens in surgery of damages and tumors of the locomotor system]. *Vestnik sluzhby krovi Rossii* [Bulletin of the service of blood of Russia], 2012, no. 1, pp. 34–36.
23. Shurygina, L. V., Kravtsov A. A., Zlishcheva E. I., Androsova T. V., Zlishcheva L. I., Lobova N. N. Vliyaniye ekstraktov kornya i nadzemnoy chasti *Astragala pereponchatogo* (*Astragalus membranaceus* (Fish.) Bunge) na nekotorye mekhanizmy destruktivnykh protsessov, protekayushchikh v neyronakh [Effect of extracts of roots and aerial parts of *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bunge on some mechanisms of the destructive toc processes that occur in neurons]. *Vestnik Voronezhskogo Gosudarstvennogo Universiteta* [Proceeding of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy], 2014, no. 4, pp. 149–153.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАПТОПРИЛА ПО РЕАКЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ 1,10-ФЕНАНТРОЛИНА И МЕДИ (I)

Хабарова Ольга Васильевна, кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры органической, неорганической и фармацевтической химии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет» 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 20а, тел.: (8512) 49-41-56, e-mail: asu@asu.edu.ru.

Серова Ксения Анатольевна, магистрант II курса биологического факультета, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет», 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 20а, тел.: (8512) 49-41-56, e-mail: ksusha-19.94@mail.ru.

Мажитова Марина Владимировна, доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой химии фармацевтического факультета, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия 414000 г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-41-43, e-mail: admed@yandex.ru.

Предметом исследования был выбран каптоприл («Каптоприл», ООО «Пранафарм», Россия) как доступное, эффективное и часто применяемое антигипертензивное средство. Каптоприл определяли косвенным путем: входящая в состав каптоприлатиольная группа восстанавливала медь (II) до одновалентного состояния, после чего 1,10-фенантролин образовывал с медью (I) окрашенное соединение ($\lambda = 4 \times 10^{-7}$ м). Исследование получаемой системы проводили спектрофотометрическим методом. Для увеличения чувствительности методики определения каптоприла было изучено влияние стабилизаторов на систему (аскорбиновая, лимонная кислоты). Представлена сравнительная характеристика различных методов определения каптоприла в растворе: йодометрия, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография. На основе полученных данных для изучаемой системы была выведена градуировочная зависимость, позволяющая проводить количественное определение каптоприла.

Ключевые слова: каптоприл, фенантролин, медь, комплексное соединение, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, йодометрия, количественное определение.

THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CAPTOPRIL THROUGH THE FORMATION OF COMPLEX COMPOUND OF 1,10-FENANTROLIN AND COPPER (I)

Khabarova Ol'ga V., Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor, Astrakhan State University, 20a Tatishchev St., Astrakhan, 414056, Russia, tel.: (8512) 49-41-56, e-mail: asu@asu.edu.ru.

Serova Ksenia A., 2nd-year master's student, Faculty of Biology, Astrakhan State University, 20a Tatishchev St., Astrakhan, 414056, Russia, tel.: (8512) 49-41-56, e-mail: ksusha-19.94@mail.ru.

Mazhitova Marina V., Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Head of Department, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: (8512) 52-41-43, e-mail: admed@yandex.ru.

Captopril (trade name: captopril, manufacturer: «Pranafarm» Ltd., Samara, Russia) as an available, effective and often applied antihypertensive drug was chosen as the object of the research. Captopril was defined by the indirect way: the thiol group that is included into captopril restored copper (II) into its monovalent state, and then 1,10-fenantroline formed the colored copper (I) compound ($\lambda = 4 \times 10^{-7}$ m). The research of the received system was performed by the spectrophotometric method. To increase the sensitivity of the methods when determining captopril authenticity the effect of stabilizers on the system (ascorbic, citric acids) was studied. In this work the comparative characteristic of various methods of determination of captopril in a solution is shown: iodometry, spectrophotometry, thin layer chromatography. Based on the obtained data, a calibration curve was derived for the system under study, allowing quantification of captopril.

Key words: captopril, fenantroline, copper, complex compound, spectrophotometry, thin-layer chromatography (TLC), iodometry, quantification.

Введение. С каждым годом объем выпускаемой продукции на фармацевтическом рынке увеличивается, в связи с чем неуклонно растет количество фальсифицированных лекарственных средств.

По этой причине сегодня вопрос определения подлинности препаратов остается актуальным.

Предметом исследования стал каптоприл как доступное, эффективное и часто применяемое антигипертензивное средство. Каптоприл – синтетический ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, широко применяемый в медицинской практике для понижения артериального давления. При гипертонии и сердечной недостаточности положительные эффекты каптоприла являются, в первую очередь, результатом подавления ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, что приводит к уменьшению концентрации ангиотензина II и альдостерона в сыворотке крови [3].

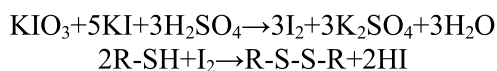
Для определения содержания каптоприла в выбранной лекарственной форме наиболее доступным в лабораторных условиях является спектрофотометрический метод, основанный на измерении светопоглощения окрашенных комплексов. В отличие от УФ-спектрофотометрии, с помощью которой выполняют количественное определение каптоприла ($\lambda = 212$ нм), предлагаемый в данном исследовании метод позволяет проводить определение каптоприла при длинах волн, лежащих в видимой области спектра.

Ранее были разработаны методы определения таких лекарственных средств, как цефтриаксон, ацетилцистеин, пиридоксид, тетрациклин, витамин B6, эмоксипин и другие [1, 4, 5].

Цель: создать и разработать методики спектрофотометрического определения каптоприла.

Материалы и методы исследования. Для определения каптоприла йодометрическим методом в работе использовали 3,6 М раствор серной кислоты, йодид калия ЧДА, крахмал и водный раствор каптоприла («Каптоприл», ООО «Пранафарм», Россия) (0,3 г препарата растворяли в 0,1 л воды). Растворы нужной концентрации готовили разбавлением водой аликвоты исходного раствора.

Количественное определение каптоприла в лекарственных препаратах, как правило, основывается на использовании его восстановительных свойств. Для определения каптоприла использовали стандартную методику, которая основана на титровании каптоприла йодом в кислой среде с использованием крахмала как индикатора [10]. Точную навеску (около 0,3 г) растворяли в 0,1 л воды в колбе с притертой пробкой, добавляли 0,01 л 3,6 М раствора серной кислоты и 1 г йодида калия, 0,002 л раствора крахмала. Титровали 0,1 М раствором йодата калия до появления голубой окраски, не исчезающей в течение 30 с. Определение каптоприла основано на окислении сульфгидрильной группы йодом:



При качественном и количественном определении каптоприла спектрофотометрическим методом в работе использовали раствор хлорида меди ($C = 10^{-2}$ моль/л), приготовленный по точной навеске $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Для этого 0,341 г растворяли в 0,2 л дистиллированной воды. Растворы нужной концентрации готовили разбавлением водой аликвоты исходного раствора. Исходный раствор 1,10-фенантролина (Phen) с концентрацией, равной $C_{\text{Phen}} = 10^{-2}$ моль/л, готовили по точной навеске реагента. Раствор лекарственного препарата каптоприла ($C = 10^{-2}$ моль/л) был приготовлен растворением исходной лекарственной формы – таблеток, содержащих 0,025 г каптоприла в 0,1 г лекарственной смеси, и очисткой раствора центрифугированием с последующим фильтрованием. Растворы солей меди (CuCl , $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4), применяемых в работе, готовили из препаратов марки ХЧ или ЧДА и дополнительной очистке не подвергали. Исследование взаимодействия реагентов проводили в среде ацетатно-аммонийных буферных растворов в интервале pH от 3,0 до 9,0. Буферные растворы представляли собой смесь уксусной кислоты CH_3COOH (0,1 М) и гидроксида аммония NH_4OH (0,1 М) в определенных объемных соотношениях. Оптические плотности растворов определяли на спектрофотометре ПЭ5400В (ЗАО «НПО Экрос», Россия) с применением 1 см кюветы в диапазоне длин волн от 325 до 500 нм.

Для количественного определения каптоприла в лекарственном препарате спектрофотометрическим методом была разработана методика, в которой тиольная группа каптоприла восстанавливает медь (II) до меди (I), образующей окрашенное комплексное соединение с 1,10-фенантролином [9, 10]. Поскольку на открытом воздухе верхняя часть смеси постепенно обесцвечивается, кювету с исследуемым раствором сверху накрывали стеклом. В работе реагенты соединяли в следующей последовательности: буферный раствор – каптоприл – медь – 1,10-фенантролин.

При исследовании условий взаимодействия меди с фенантролином в присутствии каптоприла было изучено влияние концентраций реагирующих веществ, pH среды, состава соли меди (II) ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4), стабилизатора.

Исходя из литературных данных известно, что оранжево-коричневая окраска говорит об образовании комплекса $[\text{Cu}(\text{Phen})_2]^+$ при взаимодействии меди (I) и фенантролина в соотношении 1 : 2,

соответственно [6]. Для установления влияния каптоприла на образующееся комплексное соединение использовали метод «насыщения» (молярных соотношений): концентрацию каптоприла сохраняли постоянной, а концентрации фенантролина и меди изменяли в антибатных соотношениях $C_{\text{медь(II)}} : C_{\text{Phen}}$ от 1 : 9 до 9 : 1. Приготовленные растворы фотометрировали при длине волны $\lambda = 400$ нм.

Для установления эквивалентного количества каптоприла в процессе образования комплекса $[\text{Cu}(\text{Phen})_2]^+$ в среде ацетато-аммонийного буфера готовили серию растворов, в которых неизменным сохраняли ранее установленное соотношение фенантролина и меди, равное 2 : 1, соответственно. За переменную концентрацию добавляемого компонента приняли концентрацию каптоприла, в молярном соотношении $C_{\text{каптоприл}} : C_{\text{медь(II)}}$ от 1 : 1 до 10 : 1. Приготовленные растворы фотометрировали при длине волны $\lambda = 400$ нм.

Для предотвращения обесцвечивания системы были использованы стабилизаторы: аскорбиновая кислота, лимонная кислота.

Для проверки влияния аскорбиновой кислоты на процессы, протекающие в растворе, готовили смеси: медь (II) : фенантролин : каптоприл в соотношении 1 : 2 : 6 (рН = 7) в присутствии аскорбиновой кислоты и без нее. Затем измерили оптические плотности двух растворов через минуту в течение 15 мин. Далее по полученным данным строили график зависимости оптической плотности от времени для установления влияния аскорбиновой кислоты на устойчивость системы.

При определении количества аскорбиновой кислоты, необходимой для оптимальной стабилизации системы, готовили серию растворов, в которой концентрацию аскорбиновой кислоты изменяли от $0,25 \times 10^{-4}$ до 4×10^{-4} моль/л. Медь (II), 1,10-фенантролин и каптоприл добавляли в соотношении 1 : 2 : 6, соответственно.

Из литературных источников известно, что лимонная кислота, являясь гидроксикислотой, образует стабильные комплексы с многовалентными катионами. Растворы лимонной кислоты поглощают свет в диапазоне длин волн от 340 до 360 нм [2]. По этой причине в качестве стабилизатора была выбрана лимонная кислота. Для выявления влияния лимонной кислоты на светопоглощение системы фенантролин – медь (I) – каптоприл были сняты спектры исследуемой смеси без добавления лимонной кислоты и в ее присутствии (рис. 3). Для нахождения простейшего соотношения в образующемся комплексном соединении, при котором оптическая плотность смеси «медь (II) – фенантролин – каптоприл – лимонная кислота» будет наибольшей, снимали оптическую плотность растворов, взятых в антибатных соотношениях от 1 : 9 до 9 : 1, а соотношение меди двухвалентной, фенантролина и каптоприла сохраняли неизменным, равным 1 : 2 : 6.

Для определения молярного коэффициента светопоглощения, а также для расчета константы равновесия реакции комплексообразования использовали метод Н.П. Комаря: составляли серию растворов, состоящих из меди (II), 1,10-фенантролина, каптоприла (смешивали в соотношении 1 : 2 : 6, соответственно) и стабилизатора, на фоне ацетато-аммонийного буферного раствора (рН = 7). Далее проводили измерения оптической плотности растворов при $\lambda = 410$ нм (в присутствии аскорбиновой кислоты) и при $\lambda = 380$ нм (в присутствии лимонной кислоты), используя кювету толщиной 1 см на приборе ПЭ5400В.

Для количественного определения каптоприла (в присутствии аскорбиновой кислоты) в лекарственных средствах использовали метод градуировочного графика. Для его построения готовили серию растворов, в которой возрастала концентрация каптоприла от 10^{-4} до $1,2 \times 10^{-3}$ моль/л и оставалось неизменным соотношение реагирующих веществ, то есть каптоприл, 1,10-фенантролин и медь (II) добавляли в соотношении 6 : 1 : 2 (рис. 2).

Для построения градуировочного графика определения концентрации каптоприла в присутствии лимонной кислоты (рис. 4) приготовили серию растворов, в которой увеличивали концентрацию лекарственного вещества (каптоприла), сохраняя соотношение реагирующих веществ неизменным (медь (II) : фенантролин : каптоприл : лимонная кислота = 1 : 2 : 6 : 1).

Количественное определение каптоприла осуществляли также методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [7]. Для приготовления раствора каптоприла ($C = 1,2 \times 10^{-3}$ моль/л) исходная лекарственная форма – таблетки, содержащие 25 мг каптоприла в 0,1 г лекарственной смеси, была измельчена и затем растворена в метаноле с последующей очисткой раствора центрифугированием и фильтрованием. Использовали элюент состава: уксусная кислота (лед.): бензол : вода = 1 : 3 : 1. Хроматограммы при $\lambda = 2,12 \times 10^{-7}$ м снимали с помощью денситометра «CamagTLC-Scanner 3», фирма «Camag» (Швейцария). Осуществляли количественную обработку ТСХ-хроматограмм, размером до 20×20 см. Спектральный диапазон прибора составлял от $1,9 \times 10^{-7}$ до 8×10^{-7} м, максимальная скорость сканирования – 100 мм/с. Контроль над работой всех электронных узлов сканера

осуществлялся автоматически. «Scanner 3» полностью управлялся с помощью компьютера; построение линейной регрессии для количественного определения содержания каптоприла в лекарственной форме и протоколирование результатов осуществлялось с помощью программы «WinCats - 2001» («Camag», Швейцария).

С помощью прибора AUTOMATIC TLC SAMPLER 4 («Camag», Швейцария), на хроматографическую пластину марки Sorbfil (ПТСХ-П-А-УФ) (ООО «ИМИД» Краснодар, Россия) наносили исследуемые растворы каптоприла в метаноле объемом 10 мкл. Затем нижнюю часть пластинки опускали в элюент. После достижения высоты элюента, равной 75 мм, пластинку вынимали и просушивали. Далее для первоначального визуального анализа ее просматривали в УФ-излучении ($\lambda = 2,54 \times 10^{-7}$ м). Затем пластинку помещали в денситометр для снятия спектра и дальнейшей обработки данных. Денситометрия включает в себя сканирование пятна (хроматограммы) в проходящем или отраженном свете, который затем попадает в фотоумножитель. Разность в интенсивности падающего и проходящего или отраженного света в виде электрического сигнала регистрируется на графике. Высота пика является мерой интенсивности пятна. Градуировочный график строят в координатах: масса вещества – площадь пика, причем точность измерения площади пятна денситометром составляет не менее 2–5 % [8].

Для определения каптоприла методом ТСХ был приготовлен стандартный образец каптоприла в метаноле ($C = 2 \times 10^3$ мкг/мл) и путем его разбавления получены растворы концентрацией 250, 500, 1000 мкг/мл, наносимые на пластинку в той же последовательности. Градуировочная зависимость «площадь пика, AU (Y) – количество каптоприла, мкг (X)» построена в диапазоне концентраций каптоприла 250–1 000 мкг/мл (рис. 1).

Для сравнения метрологических характеристик сопоставили результаты количественного определения, полученные йодометрией, ТСХ и спектрофотометрическими методами. Проверку правильности разработанной методики определения каптоприла с использованием меди (II) и фенантролина и сравнение ее с методом йодаметрического титрования проводили методом «введено – найдено» (табл. 3).

Статистическая обработка данных. Все опыты проводились не менее, чем в 3 повторах, данные для градуировочной кривой получали приготовлением растворов не менее, чем в 5 повторах. Расчет параметров градуировочных графиков был произведен методом наименьших квадратов (табл. 1).

Таблица 1

Градуировочные параметры

Стабилизатор	a	b	S_y	S_a	S_b	ϵ_a	ϵ_b
Аскорбиновая кислота	0,062	0,08	0,006	0,01	$6,32 \times 10^4$	0,009	$6,146 \times 10^4$
Лимонная кислота	0,217	0,057	0,006	0,009	$5,556 \times 10^4$	0,009	$5,39 \times 10^4$

Примечание: a – коэффициент линейного градуировочного графика (свободный член); b – угловой коэффициент линейного градуировочного графика; S_y – остаточное стандартное отклонение; S_a (S_b) – дисперсии для параметров a и b, соответственно; ϵ – среднеквадратичное отклонение

Соответственно, уравнение градуировочных прямых имеет следующий вид.

В присутствии аскорбиновой кислоты (рис. 2):

$$y_i = x_i \times (80 \pm 0,6146) \times 10^{-3} + (0,062 \pm 0,009)$$

В присутствии лимонной кислоты (рис. 4):

$$y_i = x_i \times (57 \pm 0,539) \times 10^{-3} + (0,217 \pm 0,009)$$

При количественном анализе содержания каптоприла в лекарственной форме методом ТСХ прослеживалась прямая зависимость интенсивности пятен и площади пиков от концентрации исследуемого лекарственного препарата в образце. Все растворы готовили в 5 повторах, математическую обработку данных осуществляли посредством программного обеспечения WinCats («Camag», Швейцария). Градуировочная зависимость «площадь пятна (Y) – количество каптоприла, мкг (X)», построенная в диапазоне концентраций каптоприла 250–1 000 мкг/мл, представлена на рисунке 3 и описывается уравнением линейной регрессии:

$$Y = (7,3 \pm 0,03) \times X + (1798,7 \pm 10,79)$$

Результаты исследования и их обсуждение. Каптоприл из-за присутствия в нем меркаптогруппы (-HS) проявляет восстановительные свойства, что подтверждается значением окислительно-восстановительного потенциала ($\phi_0 = -0,23$ В). В связи с этим определение каптоприла в лекарственных препаратах, как правило, основывается на использовании его восстановительных свойств [2]. Так, стандартная методика определения каптоприла основана на его титровании йодом в кислой

среде с использованием крахмала как индикатора. Йодометрическое титрование с использованием индикатора крахмала является легкодоступным, простым в исполнении методом, относительные погрешности которого не превышают нормы допустимых отклонений. Концентрацию каптоприла рассчитывали, используя закон эквивалентов. К недостаткам данной методики относится малая чувствительность, низкая устойчивость раствора йода и неполное протекание реакций йода со многими восстановителями.

Определение методом тонкослойной хроматографии основано на регистрировании сигнала самого каптоприла ($\lambda = 212$ нм). Исходя из представленного графика (рис. 1) был сделан вывод о том, что методом тонкослойной хроматографии можно определить концентрацию каптоприла в пределах от $9,2 \times 10^{-4}$ моль/л (250 мкг/мл) до 46×10^{-4} моль/л (1000 мкг/мл).

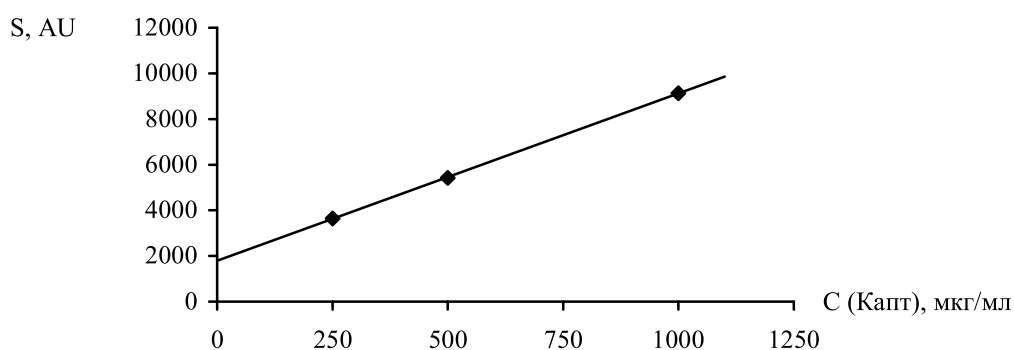


Рис. 1. Зависимость площади пика от количества каптоприла в хроматографической зоне
Примечание: *S* – площадь пика хроматограммы; *AU* – единица оптической плотности (ЕОП)

Методика является достаточно чувствительной (табл. 3), но в ней применяются токсичные вещества (бензол входит в состав элюента, метанол используется для извлечения каптоприла из лекарственной формы).

В данной работе предложен спектрофотометрический метод количественного определения каптоприла в фармакологических препаратах с использованием меди (II) и фенантролина. В основе методики лежит реакция восстановления меди двухвалентной до одновалентного состояния и взаимодействие восстановленной меди с фенантролином, в результате чего образуется комплекс коричневого цвета ($\lambda = 400$ нм) – бис-(1,10-фенантролинат) меди (I). Фенантролин относится к бидентатным лигандам, которые с центрально-координированным атомом металла образуют 5-членные циклы. Он образует комплексы с координационными связями за счет неподеленных электронных пар азота. Для системы «медь (I) – 1,10-фенантролин» внутренняя координационная сфера металла имеет форму квадрата.

Полученные экспериментальные данные показали, что нейтральная среда является оптимальной для образования изучаемого комплекса, при этом сохраняется оптимальное соотношение меди (I) : фенантролин = 1 : 2. При добавлении каптоприла в шестикратном избытке относительно количества меди (II) происходит полный переход ее из одновалентного состояния в двухвалентное. Полученные соотношения свидетельствуют о том, что тиольная группа проявляет восстановительные свойства.

В ходе проведения работы было замечено обесцвечивание той части раствора исследуемого комплекса, которая взаимодействовала с кислородом воздуха, окислявшим медь (I) до двухвалентного состояния. Для стабилизации образующегося комплекса $[\text{Cu}(\text{Phen})_2]^+$ были выбраны аскорбиновая и лимонная кислоты.

При проведении исследования было установлено, что при отсутствии стабилизатора (аскорбиновой кислоты) оптическая плотность исследуемой системы значительно снижается через 7–8 мин. В присутствии данного стабилизатора в системе, содержащей каптоприл, фенантролин, медь (II) при pH = 7, светопоглощение смеси во времени изменялось незначительно. При проведении исследования было выяснено, что добавление аскорбиновой кислоты в систему «медь (II) – фенантролин – каптоприл» не влияет на максимум светопоглощения, для стабилизации окраски исследуемой смеси необходим двукратный избыток выбранного стабилизатора.

При использовании аскорбиновой кислоты в качестве стабилизатора система характеризуется образованием комплексного соединения меди (II) и фенантролина средней устойчивости ($\beta_{обp} = 4,3 \times 10^8$) и широким интервалом определяемых концентраций (закон Бугера-Ламберта-Бера соблюдался в интервале концентраций от 10^{-4} (21,72 мкг/мл) до $1,2 \times 10^{-3}$ (260,75 мкг/мл) моль/л) (рис. 2).

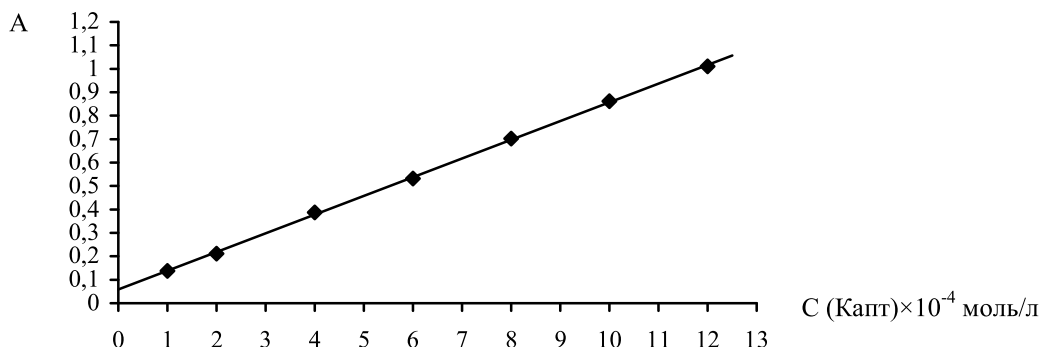


Рис. 2. Градуировочный график для определения концентрации каптоприла
 Примечание: $C_{медь(II)} = 10^{-4}$ моль/л; $C_{аск.к-та} = 2 \times 10^{-4}$ моль/л; $C_{phen} = 2 \times 10^{-4}$ моль/л; $pH = 7$;
 А – оптическая плотность раствора

При использовании лимонной кислоты в качестве стабилизатора увеличение стабильности окраски обеспечивалось за счет образования нового комплексного соединения меди одновалентной, фенантролина и лимонной кислоты, на что указывало смещение оптимальной длины волны на 20 нм ($\lambda = 380$ нм) и увеличение значения светопоглощения раствора (рис. 3).

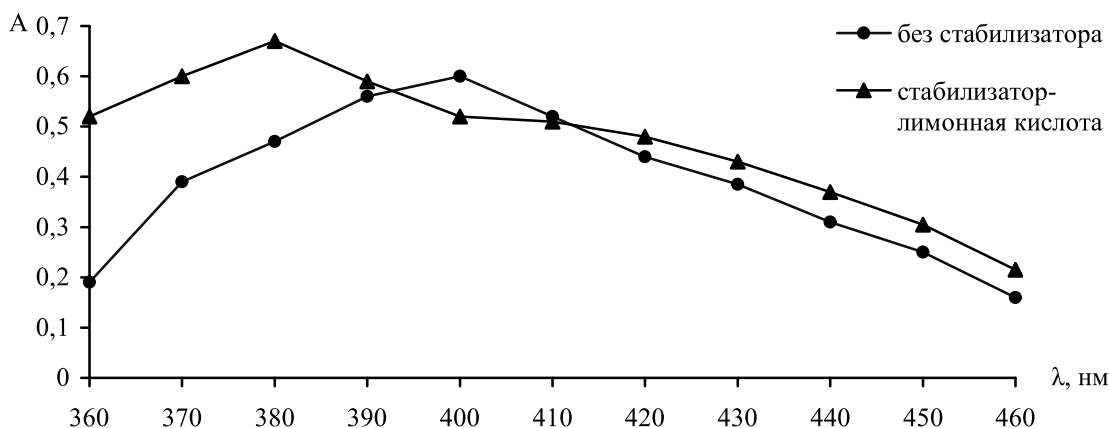


Рис. 3. Спектры поглощения растворов: 1 – в присутствии стабилизатора; 2 – без стабилизатора
 Примечание: $C_{медь(II)} = 10^{-3}$ моль/л; $C_{лим.к-та} = 10^{-3}$ моль/л; $C_{phen} = 2 \times 10^{-3}$ моль/л; $C_{каптоприл} = 6 \times 10^{-4}$ моль/л;
 А – оптическая плотность раствора; λ – длина волны

Результаты данного исследования показали, что окраска образуемого комплексного соединения, состоящего из лимонной кислоты, фенантролина и меди одновалентной, устойчивее, чем у комплекса $[Cu(Phen)]_2^+$. Установление максимального светопоглощения в присутствии стабилизатора происходило в течение 7–8 мин и сохранялось в течение долгого времени, поэтому последующие измерения производили по прошествии 7 мин. Было определено, что простейшее соотношение соответствует максимуму светопоглощения и равно медь (I) : фенантролин : лимонная кислота = 1 : 2 : 1. Из представленной на градуировочном графике (рис. 4) зависимости оптической плотности от концентрации каптоприла можно сделать вывод о том, что закон Бугера-Ламберта-Бера соблюдался в интервале концентраций от 10^{-4} (21,72 мкг/мл) до 10^{-3} (217,29 мкг/мл) моль/л.

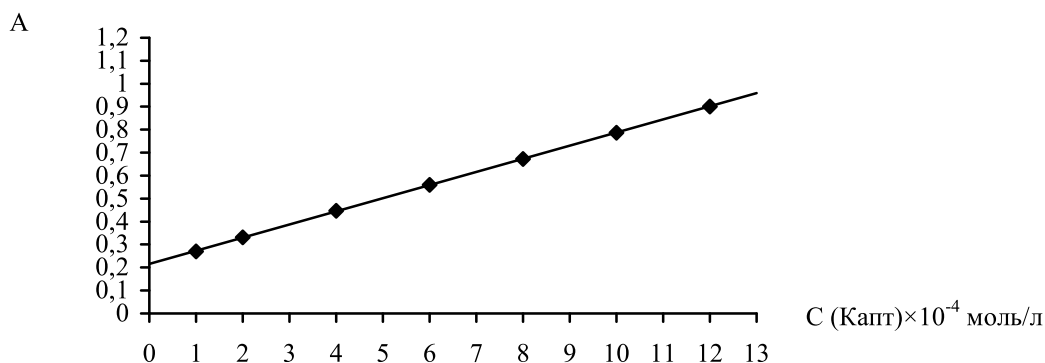


Рис. 4. Градуировочный график для определения концентрации каптоприла

Примечание: $C_{\text{медь (II)}} = 10^{-4}$ моль/л; $C_{\text{лим. к-та}} = 10^{-4}$ моль/л; $C_{\text{phen}} = 2 \times 10^{-4}$ моль/л; $\lambda = 380$ нм; $pH = 7$;
A – оптическая плотность раствора

Учитывая литературные данные [3, 4], образующийся тройной комплекс средней устойчивости ($\beta_{\text{обр}} = 3,7 \times 10^7$), содержащий медь (I), фенантролин и лимонную кислоту, может быть представлен следующим образом (рис. 5):

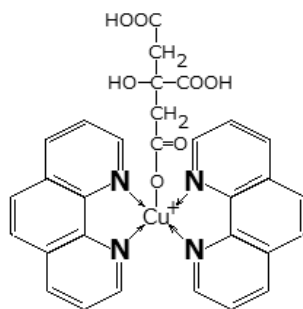


Рис. 5. Предполагаемая формула тройного комплекса (медь (I) – фенантролин – лимонная кислота)

Для выявления наиболее эффективного стабилизатора было проведено сравнение спектрофотометрических характеристик образующихся комплексов при добавлении аскорбиновой и лимонной кислот (табл. 2).

Таблица 2

Спектрофотометрические характеристики образующихся комплексов

Стабилизатор	$\epsilon_{\text{ср}}$	$\beta_{\text{обр}}$	$K_{\text{нест}}$	$pK_{\text{нест}}$
Аскорбиновая кислота	$4,91 \times 10^3$	$4,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^{-9}$	8,638
Лимонная кислота	$3,38 \times 10^3$	$3,7 \times 10^7$	$2,7 \times 10^{-8}$	7,569

Примечание: $\epsilon_{\text{ср}}$ – молярный коэффициент светопоглощения; $\beta_{\text{обр}}$ – константа образования комплекса; $K_{\text{нест}}$ – константа нестойкости комплекса; $pK_{\text{нест}}$ – отрицательный десятичный логарифм константы нестойкости комплекса

Представленные результаты указывают на то, что образующиеся комплексы имеют среднюю устойчивость.

Определение каптоприла в системе «медь (II) – фенантролин» с использованием лимонной кислоты в качестве стабилизатора является чувствительной ($\epsilon_{\text{ср}} = 3,38 \times 10^3$) методикой и обладает широким диапазоном определяемых концентраций (от 10^{-4} до 10^{-3} моль/л), однако она уступает по показателям (табл. 2, рис. 2, рис. 4) методу, в котором стабилизатором является аскорбиновая кислота.

Проверку правильности разработанной методики определения каптоприла с использованием меди (II) и фенантролина и сравнение ее с методами йодатриметрического титрования и ТСХ проводили методом «введено – найдено». Результаты сравнения представлены в таблице 3.

Результаты определения каптоприла в растворе различными методами

Метод	n	Введено мкг/мл	Найдено мкг/мл	$X_{cp} \pm \frac{S \times t}{\sqrt{n}}$	Относительная погрешность, %
Спектрофотометрический*	3	250	247,75	247 ± 11	3
Йодометрический	3	250	242,5	242 ± 22	7
ТСХ	3	250	245	245 ± 12	4

Примечание: * – в качестве стабилизатора использовалась аскорбиновая кислота

Проведенные исследования показали, что воспроизводимость результатов спектрофотометрического анализа содержания каптоприла в пробе достаточно хорошая. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что разработанная методика является более точной по сравнению с йодометрическим титрованием и характеризуется лучшей воспроизводимостью. Также и тонкослойную хроматографию можно считать чувствительной методикой, однако она является менее безопасной из-за использования органических растворителей, входящих в состав элюента.

Таким образом, разработанная чувствительная методика определения каптоприла позволяет косвенно определить содержание лекарственного вещества, обладающего восстановительными свойствами по реакции взаимодействия с медью (II) и 1,10-фенантролином в присутствии аскорбиновой кислоты в качестве стабилизатора, в ходе которой образуется окрашенный комплекс $[Cu(Phen)_2]^+$.

Выводы:

1. Спектрофотометрическим методом изучены условия образования бис-(1,10-фенантролината) меди (I) в присутствии каптоприла. Максимум поглощения исследуемого комплексного соединения $\lambda_{max} = 400$ нм.
2. Установлено, что каптоприл не влияет на оптимальное соотношение концентраций меди (I) и фенантролина, равное 1 : 2, соответственно.
3. Максимальный выход комплекса наблюдается в нейтральной среде (pH = 7).
4. Для полного образования комплекса медь (I) – Phen требуется шестикратный избыток каптоприла в системе по отношению к исходному количеству ионов меди (II) в растворе.
5. Установлено стабилизирующее действие аскорбиновой и лимонной кислот, влияние их концентраций на образование исследуемого комплексного соединения.
6. Рассчитаны молярный коэффициент поглощения и константа устойчивости комплексного соединения для системы в ацетато-аммонийном буферном растворе ($\epsilon_{cp} = 3,65 \times 10^3$; $\beta_{обр.} = 4,56 \times 10^7$) в присутствии аскорбиновой ($\epsilon_{cp} = 4,91 \times 10^3$) и лимонной ($\epsilon_{cp} = 3,38 \times 10^3$) кислот.
7. Вычислены градуировочные характеристики изучаемой системы. Составлены уравнения градуировочных прямых.
8. Показано, что предлагаемая методика спектрофотометрического определения каптоприла более чувствительна и характеризуется большим диапазоном определяемых концентраций по сравнению с йодометрическим титрованием и тонкослойной хроматографией.

Список литературы

1. Мажитова, М. В. Исследование возможности определения эмоксипина по его реакции с м-крезолфталексином SA и в присутствии ионов железа / М. В. Мажитова, М. А. Карибьянц // Естественные науки. – 2009. – № 1. – С. 33–41.
2. Северин, Е. С. Биохимия : учебник для вузов / Е. С. Северин. – М. : Медицина, 2000. – 779 с.
3. Тюкавкина, Н. А. Биоорганическая химия : учебник / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков, С. Э. Зубарян. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 528 с.
4. Хабарова, О. В. Исследование влияния ацетилцистеина на комплексообразование железа (III) с 1,10-фенантролином / О. В. Хабарова, К. А. Серова, Е. В. Самотаева, Е. А. Хандусенко, Ж. Х. Мадькова, Е. В. Бровко, М. С. Данилова // Инновации в науке. – 2014. – № 39. – С. 8–13.
5. Хабарова, О. В. Определение цефтриаксона реакцией с железом (III) и органическим реагентом / О. В. Хабарова, М. С. Данилова // Актуальные вопросы развития науки : мат-лы Международной научно-практической конференции : в 6 ч. (Уфа, 14.02.2014) / отв. ред. А. А. Сукиасян. – Уфа : Башкирский государственный университет, 2014. – С. 255–258.
6. Li, Y. Flow injection chemiluminescence determination of thiol-containing drugs based on a quinie-sensitized permanganate reaction / Y. Li, A. Zhang, J. Du, J. Lu // Anal. Lett. – 2003. – Vol. 36, № 4. – P. 13–15.

7. Migdalof, B. H. Thin-Layer Radiochromatographic Determination of Captopril (SQ 14,225) and its Disulfide Dimer Metabolite in Blood / B. H. Migdalof, S. M. Singhvi, K. J. Kripalani // *Journal of Liquid Chromatography*. – 2006. – P. 857–865. – Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01483918008060197>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения : 20.09.2016.
8. Phulgarhn, J. A. M. Sensitive determination of captopril by time-resolved chemiluminescence using the stopped-flow analysis based on potassium permanganate oxidation / J. A. M. Phulgarhn, L. F. G. Bermejo // *Anal. Chim. Acta*. – 2005. – Vol. 546, № 1. – P. 321–325.
9. Schmidt, Jr. E. Flowinjection iodometric determination of captopril in pharmaceutical preparations / Jr. E. Schmidt, W. R. Melchert, F. R. P. Rocha // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 20, № 2. – P. 8–13.
10. Tzanavaras, P. D. Flow and Sequential Injection Manifolds for the Spectrophotometric Determination of Captopril Based on its Oxidation by Fe (III) / P. D. Tzanavaras, D. G. Themelis, A. Economou, G. Theodoridis // *Microchim. Acta*. – 2003. – Vol. 142. – P. 88–91.

References

1. Mazhitova M. V., Karib'yants M. A. Issledovanie vozmozhnosti opredeleniya emoksipina po ego reaktsii s m-krezolftaleksinom SA i v prisutstvii ionov zheleza [Investigation the possibility of determining emoxipine by reaction with m-krezolftaleksinom SA and in the presence of iron ions]. *Estestvennye nauki* [Natural science], 2009, no. 1, pp. 33–41.
2. Severin E. S. *Biokhimiya: uchebnik dlya vuzov* [Biochemistry: textbook for university students]. Moscow, Meditsina [Medicine], 2000, 779 p.
3. Tyukavkina N. A., Baukov Yu. I., Zubaryan S. E. *Bioorganicheskaya khimiya: uchebnik* [Bioorganic chemistry: textbook]. Moscow, GEOTAR-Media, 2010, 528 p.
4. Khabarova O. V., Serova K. A., Samotaeva E. V., Khandusenko E. A., Madykova Zh. Kh., Brovko E. V., Danilova M. S. Issledovanie vliyaniya atsetiltsisteina na kompleksoobrazovanie zheleza (III) s 1,10-fenantrolinom [Research of influence of acetylcysteine on iron with 1.10-phenanthroline complexing]. *Innovatsii v nauke* [Innovation in science], 2014, no. 39, pp. 8–13.
5. Khabarova O. V., Danilova M. S. Opredelenie tseftriaksona reaktsiey s zhelezom (III) i organicheskim reagentom [Ceftriaxone determination by reaction with iron (III) and organic reagent]. *Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Aktual'nye voprosy razvitiya nauki: v 6 chastyakh"* [Materials of International Scientific-Practical Conference "Actual Problems of the Development of Science" in 6 parts]. Ed. A. A. Sukiasyan, Ufa, Bashkir State University, 2014, pp. 255–258.
6. Li Y., Zhang A., Du J., Lu J. low injection chemiluminescence determination of thiol-containing drugs based on a quinie-sensitized permanganate reaction. *Anal. Lett.*, 2003, vol. 36, no. 4, pp. 13–15.
7. Migdalof B. H., Singhvi S. M., Kripalani K. J. Thin-Layer Radiochromatographic Determination of Captopril (SQ 14,225) and its Disulfide Dimer Metabolite in Blood. *Journal of Liquid Chromatography*, 2006, pp. 857–865. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01483918008060197> (accessed 20 September 2016).
8. Phulgarhn J. A. M., Bermejo L. F. G. Sensitive determination of captopril by time-resolved chemiluminescence using the stopped-flow analysis based on potassium permanganate oxidation. *Anal. Chim. Acta*, 2005, vol. 546, no. 1, pp. 321–325.
9. Schmidt Jr. E., Melchert W. R., Rocha F. R. P. Flowinjection iodometric determination of captopril in pharmaceutical preparations. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2009, vol. 20, no. 2, pp. 8–13.
10. Tzanavaras P. D., Themelis D. G., Economou A., Theodoridis G. Flow and Sequential Injection Manifolds for the Spectrophotometric Determination of Captopril Based on its Oxidation by Fe (III). *Microchim. Acta.*, 2003, vol. 142, pp. 88–91.

УДК 616.45-001.1/.3:616.89-008.447
© А.Л. Ясенявская, В.Х. Мурталиева, 2017

14.03.00 – Медико-биологические науки
03.03.00 – Физиология

ИЗУЧЕНИЕ ПСИХОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ СЕМАКСА НА РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ СТРЕССА

Ясенявская Анна Леонидовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: 8-917-188-04-10, e-mail: yasen_9@mail.ru.