



УДК 340.67:615.277.3

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИКЛОФОСФАНА И ИФОСФАМИДА НА ОСНОВЕ ПОЛУЧЕНИЯ ИХ НИТРОПРОИЗВОДНЫХ

В.К. ШОРМАНОВ
М.Л. СТОЛЯРОВ

*Курский государственный
медицинский университет*

e-mail: r-wladimir@yandex.ru

В качестве нитрующего агента для циклофосфана и ифосфамида предложен 10% раствор калия нитрата в концентрированной серной кислоте. Определены оптимальные условия нитрования. Приведены уравнения калибровочных графиков для спектрофотометрического исследования циклофосфана и ифосфамида по их продуктам нитрования.

Ключевые слова: циклофосфан, ифосфамид, нитрование, спектрофотометрия, количественное определение.

Циклофосфан (ЦФ) и ифосфамид (ИФ) – это противоопухолевые лекарственные средства, являющиеся производными бис – (β – хлорэтил) – амина. Они широко применяются в медицине для лечения различных онкологических заболеваний (рак легкого, яичников, молочной железы, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, множественная миелома и др.), а также заболеваний, в патогенезе которых имеет место аутоиммунный компонент (диффузный пролиферативный гломерулонефрит, ревматоидный артрит, системный некротический васкулит и др.) [2, 3, 4].

По физическим свойствам это белые кристаллические порошки (ифосфамид – гигроскопичный) без запаха, растворимые в воде, этаноле, хлороформе, бензоле, диоксане. Температура плавления циклофосфана составляет 49-53 °С, ифосфамида – 49 °С [6].

Данные вещества характеризуются высокой токсичностью в отношении теплокровных организмов и человека. LD₅₀ циклофосфана для крыс при однократном внутривенном введении составляет 200 мг/кг, а при внутривенном – 100-160 мг/кг [3]. LD₅₀ ифосфамида для крыс – 150-190 мг/кг. Известны случаи острых и хронических отравлений данными соединениями, в том числе с летальным исходом [1, 7].

Широкое применение циклофосфана и ифосфамида, а также наличие случаев отравлений определяют их важное химико-токсикологическое значение.

Циклофосфан и ифосфамид характеризуются относительно слабой поглощающей способностью в ультрафиолетовой и видимой области спектра. Максимумам поглощения данных веществ в 96% этиловом спирте и 0,1 н. растворе кислоты хлороводородной соответствуют длины волн 201,5 нм и 201,9 нм соответственно [5].

Данные максимумы не могут быть использованы как аналитические при анализе извлечений из биологического материала, так как при указанных длинах волн результаты спектрофотометрических исследований могут искажаться под влиянием соэкстрактивных веществ биологической матрицы. В этой связи актуальным является получение производных, которые имели бы аналитический максимум, приближенный к видимой части спектра в сравнении с чистой субстанцией.

Целью данного исследования явилась разработка унифицированной методики количественного определения циклофосфана и ифосфамида на основе получения их нитропроизводных.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования явились субстанции циклофосфана (производитель – ООО «Компания «Деко») и ифосфамида (производитель – ОАО «Верофарм») с содержанием основного вещества не менее 99 %.

Точную навеску препарата количественно переносили в мерную колбу и растворяли в 25 мл 96% этилового спирта (раствор А). 1,0 мл раствора А количественно переносили в выпарительные чашки и удаляли растворитель в токе воздуха при комнатной температуре. Сухой остаток циклофосфана и ифосфамида в чашках переводили в соответствующие нитропроизводные. В качестве нитрующего агента использовался 10 % раствор калия нитрата в концентрированной серной кислоте. Время нитрования – 5 минут. Полученные растворы нитропроизводных исследовали на спектрофотометре СФ – 56 в кюветах с длиной оптического пути 10 мм в интервале длин волн 200 – 600 нм на фоне контрольного опыта, предварительно разбавив пробу 10% раствором натрия гидроксида до щелочной реакции среды. Результаты представлены в таблице 1.

Построение градуировочного графика. Для построения калибровочной прямой были выбраны максимумы при $\lambda=253,3$ нм и $\lambda=255,2$ нм для циклофосфана и ифосфамида соответственно. Готовили серии растворов с разной концентрацией нитропроизводного и измеряли их оптические плотности последовательно в порядке увеличения концентраций.



Таблица 1

**Результаты качественного спектрофотометрического исследования
нитропроизводных циклофосфана и ифосфамида**

Навеска препарата, г	V _{раствора А} , мл	№ _{max}	λ, нм	D
Раствор нитропроизводного циклофосфана				
0,0200	1,0	max № 1	253,3	0,7048
		max № 2	366,7	0,0952
Раствор нитропроизводного ифосфамида				
0,0250	1,0	max № 1	255,2	0,8657
		max № 2	363,2	0,0904

Уравнения калибровочных графиков имели общий вид:

$$D = k \cdot C \pm b$$

Расчет параметров k и b в уравнениях калибровочных графиков проводили методом наименьших квадратов. На основании полученных данных были построены калибровочные графики и рассчитаны уравнения прямых, отражающих линейную зависимость оптической плотности растворов от концентрации вещества в них. Для калибровочных графиков были рассчитаны коэффициенты корреляции r .

Результаты исследований представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

**Данные для расчета коэффициентов k , b и r калибровочного графика
нитропроизводного циклофосфана при длине волны 253,3 нм**

№	Концентрация вещества C_i , мкг/мл	Оптическая плот- ность, D_i	$(C_i)^2$	$(D_i)^2$	$C_i \cdot D_i$
1	4,0	0,0552	16	0,0030	0,2208
2	8,0	0,0835	64	0,0070	0,6680
3	20,0	0,1645	400	0,0271	3,2900
4	40,0	0,3483	1600	0,1213	13,9320
5	60,0	0,5176	3600	0,2679	31,0560
6	80,0	0,7103	6400	0,5045	56,8240
7	160,0	1,4430	25600	2,0822	230,880
Σ	372,0	3,3224	37680	3,0131	336,8708

Таблица 3

**Данные для расчета коэффициентов k , b и r калибровочного графика
нитропроизводного ифосфамида при длине волны 255,2 нм**

№	Концентрация вещества C_i , мкг/мл	Оптическая плот- ность, D_i	$(C_i)^2$	$(D_i)^2$	$C_i \cdot D_i$
1	4,0	0,0320	16	0,0010	0,1284
2	8,0	0,0718	64	0,0052	0,5744
3	20,0	0,1434	400	0,0206	2,868
4	40,0	0,3228	1600	0,1042	12,912
5	60,0	0,5320	3600	0,2830	31,92
6	80,0	0,6924	6400	0,4794	55,392
7	160,0	1,3738	25600	1,8873	219,808
Σ	372,0	3,1683	37680	2,7807	323,6028

Результаты исследования и их обсуждение. С учетом рассчитанных параметров, уравнения прямых, соответствующих прямолинейному участку калибровочных графиков для нитропроизводных циклофосфана при $\lambda=253,3$ нм и ифосфамида при $\lambda=255,2$ нм, имеют вид:

Для нитропроизводного ЦФ: $D = 0,00895 \cdot C - 0,00102$, ($r=0,9995$).

Для нитропроизводного ИФ: $D = 0,00867 \cdot C - 0,00797$, ($r=0,9995$).

На основании предварительных исследований была разработана унифицированная методика количественного определения циклофосфана и ифосфамида методом электронной спектрофотометрии на основе получения их нитропроизводных.



Около 0,020 г (точная навеска) циклофосфана или ифосфамида растворяли в 25 мл этанола (раствор А). 1,0 мл раствора А вносили в выпарительную фарфоровую чашку и удаляли растворитель в токе воздуха при комнатной температуре. Подобным образом готовили шесть параллельных образцов для анализа. Сухой остаток циклофосфана и ифосфамида в каждой чашке переводили в соответствующее нитропроизводное путем обработки 10% раствором калия нитрата в концентрированной серной кислоте в течение 5 минут.

Оптическую плотность каждого из растворов измеряли на спектрофотометре СФ-56 в кюветках с длиной оптического пути 10 мм при длинах волн $\lambda=253,3$ нм и $\lambda=255,2$ нм для циклофосфана и ифосфамида соответственно. Все измерения проводились на фоне контрольного опыта. По величине оптической плотности определяли количественное содержание вещества, используя уравнение градуировочного графика с учетом разведений.

Результаты количественного определения ($n=6, P=0,95$) представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4

Результаты количественного спектрофотометрического исследования циклофосфана при длине волны 253,3 нм

№ п/п	Навеска, г	D	Найдено		Метрологические характеристики
			г	%	
1	0,0200	0,7103	0,01987	99,35	$\bar{X} = 99,33$
2	0,0188	0,6821	0,01908	101,50	
3	0,0204	0,7122	0,01992	97,66	$S_x = 0,72$
4	0,0197	0,6466	0,01809	101,06	$\Delta \bar{X} = 1,85$
5	0,0210	0,7455	0,02085	99,30	
6	0,0214	0,7430	0,02078	97,11	$\varepsilon = 1,86 \%$

Таблица 5

Результаты количественного спектрофотометрического исследования ифосфамида при длине волны 255,2 нм.

№ п/п	Навеска, г	D	Найдено		Метрологические характеристики
			г	%	
1	0,0200	0,6924	0,02020	100,98	$\bar{X} = 99,69$
2	0,0192	0,6385	0,01864	97,09	
3	0,0213	0,7443	0,02169	101,84	$S_x = 0,75$
4	0,0202	0,6910	0,02016	99,78	$\Delta \bar{X} = 1,92$
5	0,0187	0,6273	0,01832	97,96	
6	0,0207	0,7133	0,02080	100,47	$\varepsilon = 1,93 \%$

Методика определения циклофосфана и ифосфамида методом электронной спектрофотометрии на основе получения их нитропроизводных обладает высокой чувствительностью, поэтому она может быть рекомендована для анализа извлечений из биологического материала, предположительно содержащего данные вещества.

Выводы:

1. Показана возможность количественного определения циклофосфана и ифосфамида методом электронной спектрофотометрии на основе получения их нитропроизводных.
2. Предложенная методика определения обладает высокой чувствительностью. Относительная ошибка среднего результата при этом не превышает 1,86% для циклофосфана и 1,93% для ифосфамида.

Литература

1. Влияние хронической задержки мочеиспускания и канцерогенов на развитие поверхностного рака мочевого пузыря / В. Н. Павлов, С. Л. Попов, В. З. Галимзянов и др. // Человек и его здоровье: Курский научно-практический вестник. – 2009. – № 3. – С. 121-124
2. Машковский, М. Д. Лекарственные средства. Пособие для врачей. – М.: Новая волна, 2008. – 1206 с.



3. Минаева, Л. В. Экспериментальная оценка роли изменений системы глутатиона в реализации побочных цитотоксических эффектов повторного введения циклофосфана: Дис. ... канд. мед. наук: 14.00.20, 03.00.04 / Л. В. Минаева; Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова. – СПб., 2007. – 178 с.
4. Поповская, Т. Н. Современные проблемы, достижения и перспективы онкологии (по материалам IX Российского онкологического конгресса) / Т.Н. Поповская // Международный медицинский журнал. – 2005. – №4. – С. 121-124.
5. Шорманов, В. К. Идентификация циклофосфамида и ифосфамида методом электронной спектrophотометрии. / В. К. Шорманов, М. Л. Столяров // Всерос. науч.-практ. конф. С международным участием «Биомедицинская инженерия и биотехнология». – Курск, 2012. – С. 102-105.
6. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 4th Edition / A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop, J. Watts. – London: The Pharmaceutical Press, 2011. – 2473 p.
7. Imtiaz, S. Ifosfamide neurotoxicity in a young female with a remarkable response to thiamine / S. Imtiaz, N. Muzaffar // J. Pak. Med. Assoc. – 2010. – V.60, №10. – P. 867-869.

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CYCLOPHOSPHAMIDE AND IFOSFAMIDE BY OBTAINING THEIR NITRO – DERIVATES

V.K. SHORMANOV
M.L. STOLYAROV

*Kursk State
Medical University*

e-mail: r-wladimir@yandex.ru

A 10% solution of potassium nitrate in concentrated sulfuric acid was offered as the nitrating agent for cyclophosphamide and ifosfamide. The optimal conditions for the nitration were determined. The equations of calibration graphs for spectrophotometric study of cyclophosphamide and ifosfamide by their nitration products were shown.

Keywords: cyclophosphamide, ifosfamide, nitration, spectrophotometry, quantitation.