

УДК 541.49: 543.426: 546.65

**А. В. Анельчик¹, И. И. Леоненко², Ю. В. Скрипинец², А. В. Егорова²,
В. И. Павловский²**¹ОДО „ИНТЕРХИМ”

Одесса, Люстдорфская дорога, 86, 65080, Украина

²Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины

Одесса, Люстдорфская дорога, 86, 65080, Украина

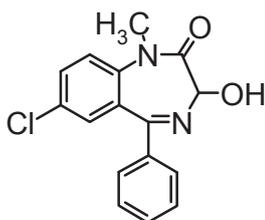
E-mail address: yegorova@interchem.com.ua

**ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМАЗЕПАМА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗНОЛИГАНДНОГО КОМПЛЕКСНОГО
СОЕДИНЕНИЯ ТЬ(III)**

Изучены спектрально-люминесцентные характеристики комплекса ТЬ(III) с представителем лекарственных препаратов бензодиазепинового ряда темазепамом (L). Максимальная интенсивность 4f-люминесценции наблюдается в присутствии анионного детергента – лаурилсульфата натрия (ЛС). Для люминесцентного определения L в качестве аналитической формы предложен разнолигандный комплекс ТЬ(III):L:ЛС = 1:1:2. Разработана методика люминесцентного определения темазепама в таблетированной лекарственной форме с пределом обнаружения 0,25 мкг/мл.

Ключевые слова: сенсibilизированная люминесценция, тербий, темазепам, разнолигандный комплекс.

Темазепам (L, 7-Хлор-1,3-дигидро-3-гидрокси-1-метил-5-фенил-2Н-1,4-бензодиазепин-2-он) — седативный препарат бензодиазепинового ряда, применяемый при нарушении сна различного генеза, премедикации при подготовке к оперативным вмешательствам и диагностическим процедурам. По химическому строению является 3-гидроксипроизводным 1,4-бензодиазепина [1].



Темазепам, L

Широкое применение в медицинской практике анксиолитиков бензодиазепинового ряда и требования аналитического контроля качества этих препаратов обуславливают необходимость разработки простых, экспрессных и высокочувствительных методик их определения в дозированных лекарственных формах и биожидкостях. Ранее предложены различные методы определения темазепама в биожидкостях (высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием [2–5], ВЭЖХ [6, 7]) и дозированных лекарственных формах (дифференциальная спектрофотометрия [8], спектрофотометрия [9], вольтамперометрия

[10, 11], флуориметрия [12]). Фармакопея США рекомендует проводить определение основного вещества в дозированных лекарственных препаратах, содержащих темазепам, методом ВЭЖХ [13]. Однако, большинство известных ВЭЖХ-методик определения темазепама трудоемки, а спектрофотометрические и вольтамперометрические не всегда обеспечивают нужную чувствительность.

Комплексные соединения ионов лантанидов Ln(III) широко применяют для люминесцентного определения биологически активных соединений (БАС), выступающих в качестве лигандов [14–17]. Эффективность 4f-люминесценции таких комплексов определяется наличием функциональных групп в БАС, ответственных за процесс комплексообразования, а так же зависит от соответствия энергий триплетных уровней лигандов и возбужденных уровней ионов лантанидов. Возможность определения БАС без отделения их от биоматрицы позволяет использовать сенсibilизированную люминесценцию лантанидов (СЛЛ) в анализе различных биологических объектов [18].

В данной работе показана возможность определения темазепама с помощью сенсibilизированной люминесценции ионов Tb(III) в дозированной лекарственной форме. Для этой цели предложена новая аналитическая форма – разнолигандный комплекс (РЛК) Tb(III):L:ЛС = 1:1:2.

Материалы и методы

В работе использовали реактивы квалификации не ниже ч.д.а., бидистиллированную воду, фармацевтическую субстанцию темазепама, исходный раствор которой (1×10^{-3} моль/л) получали растворением точной навески в этаноле. Точные навески поверхностно-активных (ПАВ) и донорно-активных (ДАВ) веществ растворяли в воде.

Стандартный раствор хлорида тербия (0,01 моль/л) готовили из его оксида высокой чистоты. Концентрацию металла определяли комплексонометрически.

Необходимые значения pH среды создавали с помощью 40%-ного водного раствора уротропина и ацетатно-аммиачных буферных растворов.

Спектры возбуждения люминесценции и люминесценции, а также кривые ее затухания регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian) с ксеноновой лампой 150 W. Все измерения проводили при комнатной температуре (21–23°C). Спектры люминесценции ионов тербия (III) регистрировали в области 450–650 нм с $\lambda_{\text{макс}} = 490, 545, 590$ и 620 нм (переходы $^5D_4 \rightarrow ^7F_6, ^5D_4 \rightarrow ^7F_5, ^5D_4 \rightarrow ^7F_4, ^5D_4 \rightarrow ^7F_3$, соответственно).

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC (Shimadzu) с использованием кварцевых кювет ($l = 1$ см). Значения времен жизни возбужденного состояния ионов тербия вычисляли с использованием программного обеспечения Cary Eclipse. Значения энергии триплетного уровня L определяли из спектров фосфоресценции его гадолиниевого комплекса при 77°K [19].

Значения pH растворов измеряли с помощью pH-метра Lab 850 (Schott Instruments GmbH, Germany) со стеклянным электродом, калибровку которого проводили с помощью стандартных буферных растворов.

Результаты и их обсуждение

Спектрально-люминесцентные характеристики. Установлены спектрально-люминесцентные характеристики темазепама и его комплексного соединения с тербием (III).

Спектр поглощения L в этанольном растворе характеризуется наличием двух полос в УФ-области спектра с максимумами при 229 нм и 305 нм с молярными коэффициентами светопоглощения: $\epsilon = 29800 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ и $\epsilon = 2050 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, соответственно. Энергия триплетного уровня (T) L (23360 см^{-1}) выше энергии первого возбужденного уровня Tb(III) (5D_4 ; 20500 см^{-1}). Это означает, что при комплексообразовании возможен перенос энергии возбуждения от лиганда L к иону Tb(III).

Установлено, что большинство органических растворителей, в том числе этанол, не влияют на интенсивности люминесценции ($I_{\text{люм}}$) комплекса; ацетон практически полностью гасит $I_{\text{люм}}$ комплекса, а диметилформамид и диметилсульфоксид – незначительно увеличивают. Так как темазепам практически нерастворим в воде, но легко растворим в этаноле, вся дальнейшая работа выполнена в водно-этанольной среде.

Методом ограниченного логарифмирования определено соотношение компонентов в двойном комплексном соединении Tb(III) : L=1 : 2. Установлено, что в случае координационно-ненасыщенного комплексного соединения (в избытке металла) Tb(III) : L = 1:1 интенсивность 4f-люминесценции зависит от введения поверхностно-активных (ПАВ) и донорно-активных веществ (ДАВ) (рис. 1).

Из рисунка 1 видно, что ДАВ, а также катионные и неионогенные ПАВ не оказывают значительного влияния на $I_{\text{люм}}$ комплекса. Значительное увеличение $I_{\text{люм}}$ наблюдается только в присутствии анионных ПАВ. Наибольшее увеличение $I_{\text{люм}}$ для комплекса Tb(III) – L (~7,5 раз) достигается в присутствии ЛС в результате образования РЛК: Tb(III):L:ЛС=1:1:2, соотношение компонентов в котором определено методом ограниченного логарифмирования. В пользу образования РЛК, кроме значительного увеличения $I_{\text{люм}}$ (рис. 2, а), также свидетельствует увеличение времени жизни его люминесценции (рис. 2, б).

Образование РЛК наблюдается в широком интервале pH 3,0 – 10,5 с максимумом $I_{\text{люм}}$ при pH 7,0 (рис. 3). Оптимальное pH раствора создают добавлением 40%-ного раствора уротропина.

Интенсивность люминесценции максимальна через 10 мин после смешивания компонентов и постоянна в течение 2 ч.

На основании люминесцентных свойств комплексов в качестве аналитической формы для определения темазепама в дозированной лекарственной форме (таблетках «Сигнопам») выбран РЛК Tb(III) – L – ЛС. Для подтверждения правильности результатов люминесцентного способа разработана также альтернативная методика спектрофотометрического определения темазепама по его собственному поглощению при 229 нм.

Методики количественного определения

Содержание темазепама в таблетках «Сигнопам» определяли методом стандартного образца. Для валидации разработанных методик по показателям линейности и диапазонам использования приведены соответствующие градуировочные графики.

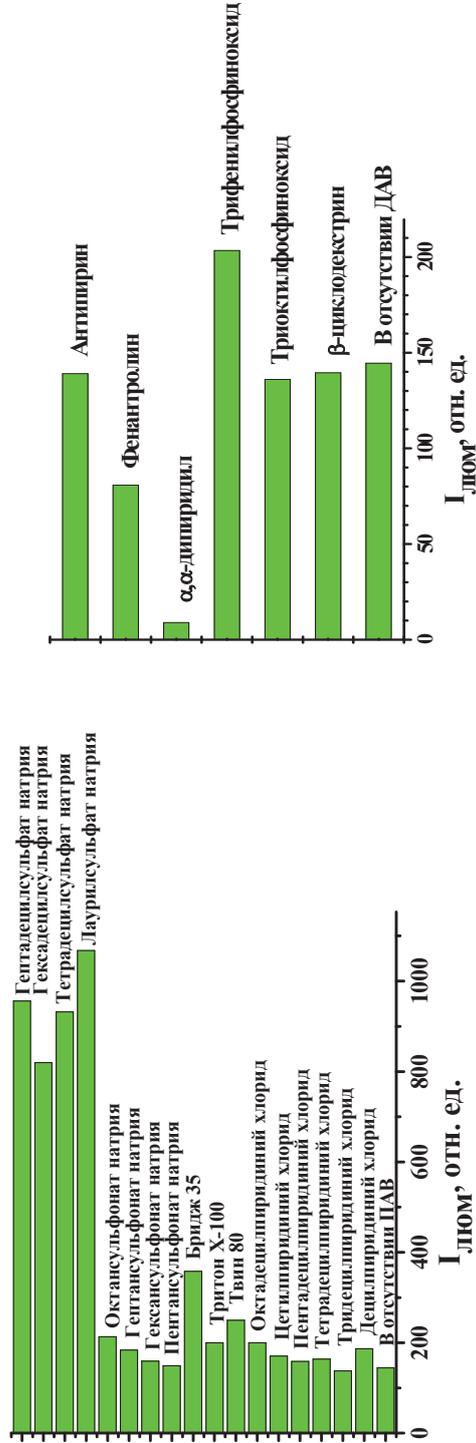


Рис. 1. Влияние ПАВ и ДАВ на I_{люм} комплекса Tb(III) – L (C_{Tb}=C_{ПАВ}=C_{ДАВ}=1×10⁻³ моль/л; C_{Тритон X-100}=C_{Твин 80}=0,1%; C_L=1×10⁻⁴ моль/л).

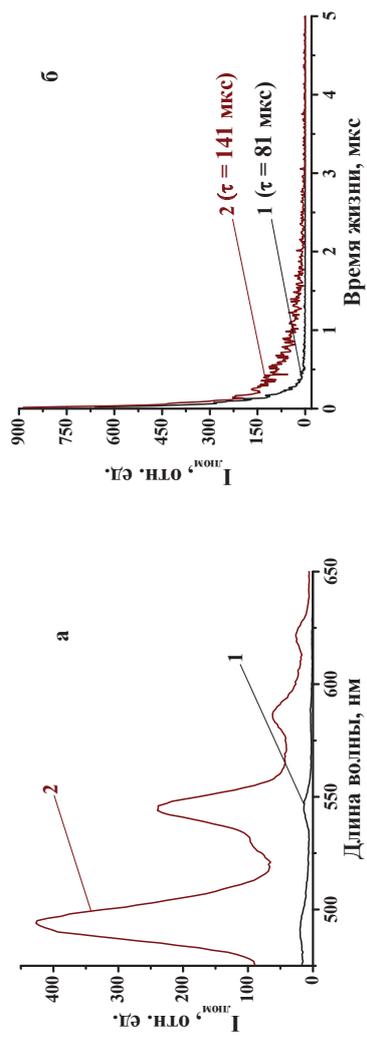


Рис. 2. Спектры люминесценции (а) и кривые затухания люминесценции (б) комплексов: Tb(III) – L (1) и Tb(III) – L – LС (2) (C_{Tb}=C_{ЛС}=1·10⁻³ моль/л; C_L=1·10⁻⁴ моль/л)

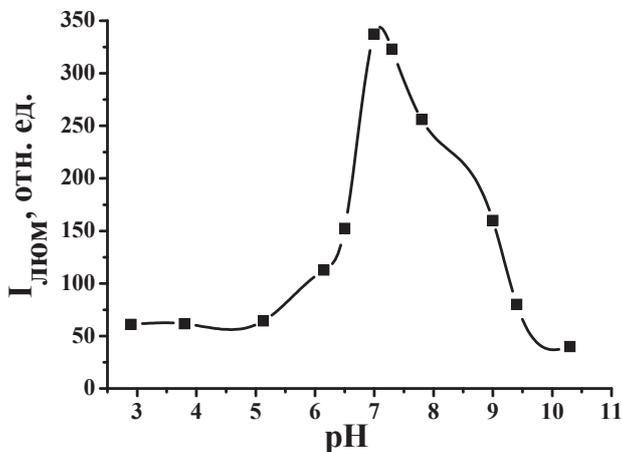


Рис. 3. Зависимость $I_{\text{люм}}$ комплекса Tb(III) – L – ЛС от pH среды ($C_{\text{Tb}}=C_{\text{ЛС}}=1 \times 10^{-3}$ моль/л; $C_{\text{L}}=1 \times 10^{-4}$ моль/л)

Градуировочный график для люминесцентного определения

В ряд мерных колб вместимостью 10,0 мл помещают 1,0 мл 0,01 моль/л раствора хлорида тербия, прибавляют 0,5; 1,0 мл стандартного раствора темазема (10 мкг/мл) и 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0 мл стандартного раствора темазема (100 мкг/мл), доводят объем до 2,0 мл этанолом; затем прибавляют 0,3 мл 40%-ного водного раствора уротропина, 1,0 мл 0,01 моль/л раствора ЛС. Растворы доводят до метки водой и перемешивают. Через 10 мин измеряют интенсивность люминесценции при $\lambda_{\text{эмис}} = 545$ нм ($\lambda_{\text{возб}} = 250$ нм) (рис. 4, а). Градуировочный график линеен в интервале концентраций 0,5 – 20,0 мкг/мл с коэффициентом корреляции 0,9962 (рис. 4, б).

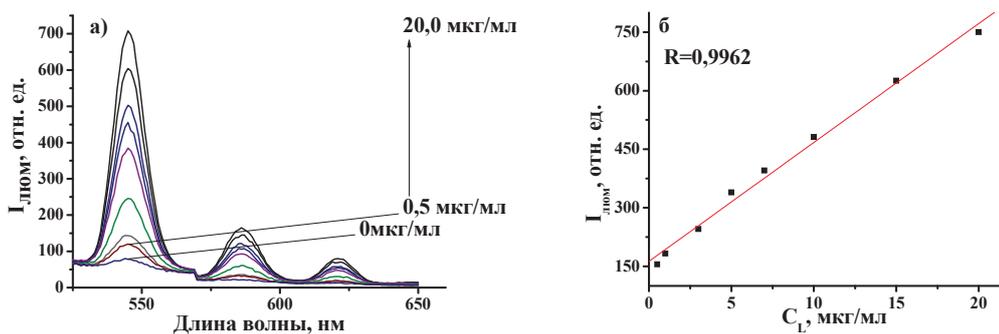


Рис. 4. Спектры люминесценции (а) комплекса Tb(III) – L – ЛС и градуировочный график (б) для определения L ($C_{\text{Tb}}=C_{\text{ЛС}}=1 \times 10^{-3}$ моль/л)

Градуировочный график для спектрофотометрического определения

В ряд мерных колб вместимостью 10,0 мл помещают 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл стандартного раствора темазепама (100 мкг/мл), доводят объем до метки этанолом и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученных растворов в максимуме при длине волны 229 нм (рис. 5, а). Градуировочный график линеен в интервале концентраций 1,0 – 25,0 мкг/мл с коэффициентом корреляции 0,9997 (рис. 5, б).

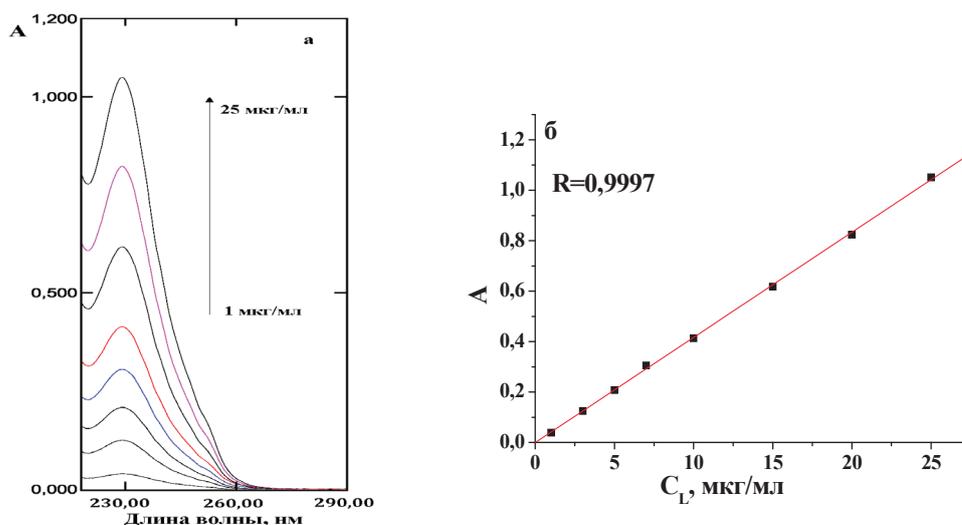


Рис. 5. Спектры поглощения (а) этанольных растворов темазепама и градуировочный график (б) для его определения

Ход анализа

Одну таблетку препарата «Сигнопам», содержащую по спецификации 10 мг темазепама, помещают в мерную колбу объемом 100,0 мл, прибавляют 0,5 мл дистиллированной воды, перемешивают в течение 5 мин., прибавляют 70 мл этанола, перемешивают на магнитной мешалке в течение 15 мин при нагревании (70°C), охлаждают. Доводят до метки тем же растворителем, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр (0,20 мкм; Minisart RC 15, “Sartorius”, Германия). 1,0 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 10,0 мл. Прибавляют все реагенты, как описано при построении соответствующего градуировочного графика, и измеряют интенсивность люминесценции ($I_{пр}$) при $\lambda_{эмис} = 545$ нм ($\lambda_{возб} = 250$ нм) или оптическую плотность (A_l) в максимуме при длине волны 229 нм.

Параллельно измеряют интенсивность люминесценции ($I_{ст}$) или оптическую плотность (A_0) раствора рабочего стандартного образца (РСО) темазепама. Для этого 0,010 г L (m_0) растворяют в 100,0 мл этанола. Аликвоту 1,0 мл полученного раствора (100 мкг/мл) помещают в мерную колбу вместимостью 10,0 мл, прибавляют все реагенты, как описано при построении соответствующего градуировоч-

ного графика. Измеряют интенсивность люминесценции ($I_{ст}$) в указанных выше условиях или оптическую плотность (A_0).

Для люминесцентного определения готовят раствор контрольного опыта, который содержит 1,0 мл этанола и все компоненты, кроме стандартного раствора темазепама, и измеряют интенсивность люминесценции (I_0) в указанных выше условиях. При расчете интенсивностей люминесценции исследуемого раствора и раствора РСО учитывают $I_{люм}$ контрольного опыта.

Содержание темазепама в одной таблетке (г) рассчитывают по формуле:

$$X_1 = \frac{I_1(A_1) \cdot m_0 \cdot 0,1 \cdot 100 \cdot 10}{I_2(A_0) \cdot 100 \cdot 10 \cdot 0,1} = \frac{I_1(A_1) \cdot m_0}{I_2(A_0)}$$

где: I_1 – интенсивность люминесценции исследуемого раствора ($I_{пр} - I_0$);
 I_2 – интенсивность люминесценции раствора РСО L ($I_{ст} - I_0$).

Результаты определения темазепама в таблетках представлены в таблице.

Таблица
 Результаты определения однородности содержания темазепама в таблетках «Сигнопам»
 10,0 мг, Тархominский фармацевтический завод «Polfa» (Польша) (P=0,95; n=5)

Содержание, мг	Люминесцентный метод		Спектрофотометрический метод	
	Найдено, мг	S _p , %	Найдено, мг	S _p , %
10,00	9,75	3,81	10,28	3,57
	9,84		9,64	
	9,73		9,86	
	10,52		10,45	
	10,41		9,72	
	X _{ср} =10,05±0,48		X _{ср} =9,99±0,44	

Разработанная люминесцентная методика использована для выполнения теста «Однородность дозирования» лекарственной формы (таблетки «Сигнопам»). Предлагаемая методика характеризуется удовлетворительными метрологическими характеристиками и простотой выполнения.

Литература

1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. – М.: «Новая Волна», 2006. – С. 30.
2. *Gunn J., Kriger S., Terrell AR.* Simultaneous determination and quantification of 12 benzodiazepines in serum or whole blood using UPLC/MS/MS // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 603. – P.107–119.
3. *Marin S.J., Coles R., Merrell M., McMillin G.A.* Quantitation of benzodiazepines in urine, serum, plasma, and meconium by LC-MS-MS // *J. Anal. Toxicol.* – 2008. – Vol. 32, №7. – P. 491–498.
4. *Rust K.Y., Baumgartner M.R., Meggiolaro N., Kraemer T.* Detection and validated quantification of 21 benzodiazepines and 3 “z-drugs” in human hair by LC-MS/MS // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 10. – P. 64–72.
5. *Moore C., Coulter C., Crompton K., Zumwalt M.* Determination of benzodiazepines in oral fluid using LC-MS-MS // *J. Anal. Toxicol.* – 2007. – Vol. 31, №9. – P. 596–600.

6. *Scott K. S., Oliver J. S.* Development of a Supercritical Fluid Extraction Method for the Determination of Temazepam in Whole Blood // *J. Anal. Toxicol.* – 1997. – Vol. 21. – P. 297–300.
7. *El-Gizawy S. M.* Simultaneous Determination of Diazepam, Oxazepam and Temazepam in Spiked Urine By HPLC // *Anal. Lett.* – 2000. – Vol. 33, №4. – P. 629–438.
8. *Kashmiri M. A., Awan S.I., Yaqoob N.* Quantative and qualitative determination of temazepam in pure and pharmaceutical samples by first order derivative spectrophotometry / *Jour. Chem. Soc. Pak.* – 2005. – Vol. 27, № 1. – P. 33–37.
9. *El-Brashy A., Aly F.A., Belal F.* Determination of 1,4-Benzodiazepines in Drug Dosage Forms by Difference Spectrometry // *Microchim. Acta.* – 1993. – Vol. 110. – P. 55–60.
10. *Chan H. K., Fogg A. G.* Polarographic determination of temazepam in soft gelatin capsule formulations // *Analyst* – 1981. – Vol. 106. – P. 768–775.
11. *Tyszczyk K.* Determination of Diazepam, Temazepam and Oxazepam at the Lead Film Electrode by Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry // *Electroanalysis* – 2010. – Vol. 22, № 17-18. – P. 1975–1974.
12. *Walash M.I., Belal F., Metwally M.E., Hefnawy M.M.* A selective fluorimetric method for the determination of some 1,4-benzodiazepine drugs containing a hydroxyl group at C-3 // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1994. – Vol. 12, № 11. – P. 1417–1423.
13. *The United States Pharmacopeia 30* – 2007. – P. 3290.
14. *Goèmez-Hens A., Aguilar-Caballós M.* Terbium-sensitized luminescence: a selective and versatile analytical approach // *Trends Anal. Chem.* – 2002. – Vol. 21, № 2. – P. 131 – 141.
15. *Rieutord A., Prognon P., Brion F., Mahuzier G.* Liquid chromatographic determination using lanthanides as time-resolved luminescence probes for drugs and xenobiotics: advantages and limitation // *Analyst.* – 1997. – Vol. 122, № 5. – P. 59–66.
16. *Eliseeva S.V. and Bunzli J.-C.* Lanthanide luminescence for functional materials and biosciences // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – Vol. 39. – P. 189 – 227.
17. *Егорова А.В., Скрипинец Ю.В., Александрова Д.И., Антонович В.П.* Сенсibiliзована люмінесценція іонів лантанидів і її застосування в біоаналізі (обзор) // *Методи і об'єкти хімічного аналізу.* – 2010. – Т.5, №4. – С.180 – 203.
18. *Бельтокова С.В., Егорова А.В., Теслюк О.И.* Іспользование f-f люмінесценції іонів Eu(III) и Tb(III) в аналізі лікарських препаратів // *Укр. хім. журн.* – 2000. – Т.66, №10. – С. 115 – 121.
19. *Паркер С.* Фотолюмінесценція розчинів. М.: Мир, 1972. – 503 с.

Стаття надійшла до редакції 13.09.12

**Г. В. Анельчик¹, І. І. Леоненко², Ю. В. Скрипинець², А. В. Егорова²,
В. І. Павловський²**

¹ТДВ „ІНТЕРХІМ”

вул. Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна.

²Фізико-хімічний інститут ім. О.В.Богатського НАН України,

вул. Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна.

ЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ТЕМАЗЕПАМУ З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНОЛІГАНДНОЇ КОМПЛЕКСНОЇ СПОЛУКИ ТЬ(III)

Вивчені спектрально-люмінесцентні характеристики комплексу Ть(III) з представником лікарських препаратів бензодіазепінового ряду темазепамом (L). Максимальна інтенсивність 4f-люмінесценції спостерігається у присутності аніонного детергента – лаурилсульфату натрію (ЛС). Для люмінесцентного визначення L в якості аналітичної форми запропоновано різнолігандний комплекс Ть(III):L:ЛС = 1:1:2. Розроблена методика люмінесцентного визначення темазепаму в таблетованій лікарській формі з межею виявлення 0,25 мкг/мл.

Ключові слова: сенсibiliзована люмінесценція, тербій, темазепам, різнолігандний комплекс.

**A. V. Anelchik¹, I. I. Leonenko², Yu. V. Scripinets², A. V. Yegorova²,
V. I. Pavlovsky²**

¹«INTERCHEM SLC»

Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

²A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute

of the National Academy of Sciences of Ukraine,

Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

LUMINESCENCE DETERMINATION OF TEMAZEPAM WITH THE USE OF Tb(III) TERNARY COMPLEX

Summary

Sensitized luminescence of Tb(III) ions has been studied. It has been shown that the intramolecular transfer of excitation energy from the molecule of ligand to lanthanide ion was observed. Spectral-luminescent characteristics of Tb(III) complex with the representative of benzodiazepines drugs temazepam (L) have been investigated.

The interaction of the Tb(III) – L complex has been examined by using UV-visible absorption and luminescence spectroscopy. The maximum intensity of 4f-luminescence has been observed in presence of the anionic detergent sodium dodecyl sulfate (DS). The Tb(III) – L – DS complex shows an up to 7,5-fold enhancement of luminescence intensity upon addition of DS. The life time (81 μ s) has been found for Tb(III) – L in absence of DS which increase up to 141 μ s, in presence of DS. The ternary complex Tb(III):L:DS = 1:1:2 has been proposed for luminescence determination of temazepam as an analytical form.

Optimal conditions have been found at concentrations of Tb(III) and L ($C_{Tb} = 1 \times 10^{-3}$ mol/l; $C_L = 1 \times 10^{-4}$ mol/l) at pH 7,0. Under these conditions, the luminescence intensity is linearly dependent on the concentration of L between 0,5-20,0 μ g/ml. The method for luminescent determination of temazepam has been developed in dosage form – tablets with limit of determination 0,25 μ g/ml.

Key words: sensitized luminescence, terbium, temazepam, ternary complex.